

平成 26 年度

博士論文

脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻動態生理学講座

石澤里枝

平成 26 年度

博士論文

脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻動態生理学講座

1123032302

石澤里枝

指導教員 増田和実

## 目次

略号と記号	…iv
List of Figures	…viii
List of Tables	…x
参考論文	…xi
I. 緒言	…1
II. 先行研究	…3
1. 脂肪酸	…3
A. 構造と物性	…3
B. 長鎖脂肪酸の消化吸収と代謝	…4
C. 中鎖脂肪酸の消化吸収と代謝	…6
D. 中鎖脂肪酸摂取の効果	…7
a. 熱産生効果	…7
b. 体脂肪抑制効果	…8
2. 骨格筋における脂質代謝	…9
A. 脂肪酸の輸送と酸化	…9
B. 脂肪酸結合タンパク質	…11
C. PPAR	…13
a. 構造	…13
b. リガンド	…14
c. アイソフォーム	…18
3. ミトコンドリア	…19
A. 構造と機能	…19

B. 増殖機序	…22
a. mitochondria DNA と遺伝子発現調節	…22
b. nucleus DNA と遺伝子発現調節	…22
c. PGC-1 $\alpha$	…24
d. 持久的トレーニング	…27
e. 脂質食	…28
III. 研究目的及び検討課題	…31
IV. MCFA 脂質食によるラット骨格筋	
ミトコンドリア関連酵素の増加（実験 I）	…35
1. 目的	…35
2. 方法	…35
3. 結果	…41
4. 考察	…47
5. 要約	…51
V. MCFA による骨格筋細胞の	
ミトコンドリア関連タンパク質の変化（実験 II）	…52
1. 目的	…52
2. 方法	…52
3. 結果	…57
4. 考察	…61
5. 要約	…64
VI. PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価	
（実験 III）	…65
1. 目的	…65
2. 方法	…65



3. 結果	…71
4. 考察	…77
5. 要約	…80
VIII. 討論	…81
1. MCFA 脂質食による骨格筋ミトコンドリア生合成	…81
2. デカン酸およびケトン体による 骨格筋ミトコンドリア生合成	…83
3. MCFA およびケトン体による PPARs への非結合	…84
4. MCFA およびケトン体によるヒストンアセチル化	…85
IX. 総括	…89
謝辞	…91
参考文献	…92

## 略号と記号

ADP	: adenosine diphosphate, アデノシン二リン酸
AICAR	: AICA riboside, AICA リボシド
AMP	: adenosine monophosphate, アデノシン一リン酸
ATP	: adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸
$\beta$ -HAD	: $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, $\beta$ -ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素
cAMP	: cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, サイクリックアデノシン 3', 5'一リン酸
CBP	: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein, サイクリック AMP レスポンスエレメント結合タンパク
CEBP	: CCAAT/enhancer binding protein, CCAAT/エンハンサー結合タンパク質
CoA	: coenzyme A, 補酵素 A
CO <sub>2</sub>	: carbon dioxide, 二酸化炭素
COX	: cytochrome c oxidase, シトクロム c オキシダーゼ
CPT	: carnitine palmitoyltransferase, カルニチンパルミトイル転移酵素
CREB	: cAMP response element-binding protein, cAMP 応答エレメント結合タンパク質
CS	: citrate synthase, クエン酸合成
DAG	: diacylglycerol, ジアシルグリセロール
DBD	: DNA binding domain, DNA 結合領域

DIT	: diet-induced thermogenesis, 食事誘発性体熱産生
DNA	: deoxyribo nucleic acid, デオキシリボ核酸
EC50	: half maximal effective concentration, 50%効果濃度
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素免疫測定法
EPA	: eicosapentaenoic acid, エイコサペンタエン酸
FA	: fatty acid, 脂肪酸
FABPc	: cytosolic fatty acid binding protein, 細胞質脂肪酸結合タンパク質
FABPpm	: plasma membrane fatty acid binding protein, 細胞膜脂肪酸結合タンパク質
FADH2	: flavin adenine dinucleotide 2, フラビンアデニンジヌクレオチド 2
FAT/CD36	: fatty acid translocase/cluster of differentiation 36, 脂肪酸トランスロカーゼ/分化抗原群 36
FATP	: fatty acid transport protein, 脂肪酸輸送タンパク質
FFA	: free fatty acid, 遊離脂肪酸
GAPDH	: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素
gasD	: deep portion of gastrocnemius, 腓腹筋深層部
gasS	: surface portion of gastrocnemius, 腓腹筋表層部
GST	: glutathione S-transferase, グルタミン S-トランスフェラーゼ
HDAC	: histone deacetylase, ヒストン脱アセチル化酵素
HEK	: human embryo kidney, ヒト胎児由来腎臓
H-FABP	: heart-FABP, 心臓型-FABP
HSP	: heavy-strand promoter, 重鎖プロモーター

IMF	: intermyofibrillar, 筋原線維間
ITC	: isothermal titration calorimeter, 等温滴定型熱量測定
LBD	: ligand binding domain, リガンド結合領域
LCFA	: long-chain fatty acid, 長鎖脂肪酸
LCT	: long-chain triacyl glycerol, 長鎖トリアシルグリセロール
LPL	: lipoprotein lipase, リポプロテインリパーゼ
MCFA	: medium-chain fatty acid, 中鎖脂肪酸
MCT	: medium-chain triacyl glycerol, 中鎖トリアシルグリセロール
MEF2	: myocyte enhancer factor 2, 細胞活性化因子 2
MUFA	: monounsaturated fatty acid, 一価不飽和脂肪酸
mRNA	: messenger ribo nucleic acid, メッセンジャーリボ核酸
mtDNA	: mitochondrial DNA, ミトコンドリア DNA
NaCl	: sodium chloride, 塩化ナトリウム
NADH	: nicotinamide adenine dinucleotide, ニコチンアミドアデニンジ ヌクレオチド
NEFA	: nonesterified fatty acids, 非エステル化脂肪酸
NFAT	: nuclear factor activate T-cell, T 細胞活性化核因子
NRF	: nuclear respiratory factor, 核呼吸因子
O <sub>2</sub>	: oxygen, 酸素
PGC-1 $\alpha$	: peroxisome proliferated activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ コアクチベータ -1 $\alpha$
Pi	: inorganic phosphoru, 無機リン
PPARs	: peroxisome proliferator-activated receptors, ペルオキシソーム 増殖剤応答性受容体

PPRE	: peroxisome proliferator responsive element, ペルオキシソーム増殖応答エレメント
PUFA	: polyunsaturated fatty acid, 多価不飽和脂肪酸
PVDF	: polyvinylidene difluoride membranes, ポリフッ化ビニリデン
RNA	: ribonucleic acid, リボ核酸
RXR	: retinoid X receptor, レチノイド X レセプター
SCFA	: short-chain fatty acid, 短鎖脂肪酸
SFA	: saturated fatty acid, 飽和脂肪酸
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
S-HETE	: S-hydroxyeicosatetraenoic acid, ヒドロキシエイコサテトラエン酸
SPA	: scintillation proximity assay, シンチレーションプロキシミティアッセイ法
SPR	: surface plasmon resonance, 表面プラズモン共鳴
SRC	: steroid receptor co-activator, ステロイドレセプターコアクチベーター
SS	: subsarcolemmal, 筋線維鞘下
TCA	: tricarboxylic acid, トリカルボン酸
Tfam	: mitochondrial transcription factor A, ミトコンドリア転写因子 A
TG	: triglyceride, 中性脂肪
TR-FRET	: time-resolved fluorescence resonance energy transfer, 時間分解蛍光共鳴エネルギー転移
TRLR	: Toll-like receptor, Toll 様レセプター

UbcH5 : ubiquitin-conjugating enzyme E2D, ユビキチン結合酵素 E2D  
UCP : uncoupling protein, 脱共役タンパク質  
UFA : unsaturated fatty acid, 不飽和脂肪酸

## List of Figures

- Figure II-1. 3T3-L1 adipocyte differentiation assay using OA, OLA, and Rosi (Malapaka et al., 2012).
- Figure II-2. Schematic representation of classic pathways of cardiac metabolism (Doenst et al., 2013).
- Figure II-3. Structural and functional organization of nuclear receptors. (Yang et al., 2014).
- Figure II-4. The PPAR $\delta$ -GW2433 cocrystal structure (Xu et al., 1999).
- Figure II-5. Increased oxidative type I fibers and mitochondrial biogenesis in the PPAR $\delta$  transgenic mice (Wang et al., 2004).
- Figure II-6. PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\alpha$  regulate opposing muscle fiber-type programs (Gan et al., 2013).
- Figure II-7. Involvement of two genetic systems in mitochondrial biogenesis (Goffart et al., 2004).
- Figure II-8. PGC-1 stimulates mitochondrial DNA replication and biogenesis (Wu et al., 1999).
- Figure II-9. A high-fat diet induces an increase in skeletal muscle mitochondria (Hancock et al., 2008).
- Figure III-1. The structure of the present study.
- Figure IV-1. Citrate synthase (CS) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC ( $\square$ ), MCFA-rich ( $\boxtimes$ ) and LCFA-rich ( $\blacksquare$ ) diets.
- Figure IV-2. 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC ( $\square$ ), MCFA-rich ( $\boxtimes$ ) and LCFA-rich ( $\blacksquare$ ) diets.

- Figure IV-3. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) concentration in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets.
- Figure V-1. The structures of octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate.
- Figure V-2. UCP3, VDAC and COX-IV proteins of C2C12 cell treated with octanoic acid.
- Figure V-3. UCP3, VDAC and COX-IV proteins of C2C12 cell treated with decanoic acid.
- Figure V-4. UCP3, VDAC and COX-IV proteins of C2C12 cell treated with dodecanoic acid.
- Figure V-5. UCP3, VDAC and COX-IV proteins of C2C12 cell treated with  $\beta$ -hydroxybutyrate.
- Figure VI-1. The principle of Lantha screen PPARs coactivator TR-FRET assay.
- Figure VI-2. Ligand-induced binding of a coactivator to the PPAR $\alpha$  in vitro.
- Figure VI-3. Ligand-induced binding of a coactivator to the PPAR $\delta$  in vitro.
- Figure VI-4. The maximum amplitude of emission ratio in PPAR $\alpha$ .
- Figure VI-5. PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$  proteins of C2C12 cell treated with octanoic acid.
- Figure VI-6. The mechanism of mitochondrial biogenesis by LCFA, MCFA and KB.



## List of Tables

- Table IV-1. Fatty acid composition of two lipids.
- Table IV-2. Body weight, energy intake, EFP weight, EFP weight/Energy intake, plasma glucose, and adipocytokine concentrations in SC, MCFA and LCFA groups.
- Table VI-1. The measurement condition of Lantha screen PPARs coactivator TR-FRET assay in TECAN microplate reader.
- Table VI-2. EC50 values (nM) for binding of fatty acids and ketone body to PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$ .

本論文は、以下の論文および未発表の実験結果を加筆、修正して構成されている。

#### 参考論文

- (1) **Ishizawa, R.**, Masuda, K., Sakata, S. and Nakatani, A. (2014) Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. J. Oleo Sci. accepted for publication.

## I. 緒言

過去十数年間の研究の発展によって、脂質が単に膜の構成成分として機能するだけでなく、脂質が固有の役割を担っていることが明らかとなっている。生体内において様々な脂質分子が存在しているが、その基本成分や前駆体としての役割を担っているのが脂肪酸である。脂肪酸は炭素鎖長や不飽和度の違いといった構造の多様性に富み、機能も非常に多彩である。

ミトコンドリアはアデノシン三リン酸 (ATP; adenosine triphosphate) の再合成に重要な役割を担っている細胞小器官である。Holloszy and Booth (1976) によって初めて持久性トレーニングは骨格筋の cytochrome c 含量やミトコンドリア関連酵素活性を亢進させることが報告され、運動による骨格筋の重要な適応はミトコンドリアの増殖であるということが示唆された。さらに、Miller et al. (1983) によって、炭素数 14 以上の長鎖脂肪酸 (LCFA; long-chain fatty acid) を含む脂質摂取は普通食と比較してラット骨格筋のミトコンドリアを増加させ、持久性運動時間を延長させることが報告された。このように骨格筋ミトコンドリア生合成の適応はトレーニングだけでなく、脂質摂取によっても生じることがいくつかの研究によって支持されている (Hancock et al., 2009; Han et al., 1997; Miller et al., 1983)。脂質摂取による骨格筋のミトコンドリア生合成は、核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR; peroxisome proliferator-activated receptors) に対する LCFA の共有結合によって誘発される (Xu et al., 1999)。したがって、LCFA が PPARs に結合することによってミトコンドリア関連遺伝子発現の誘導をもたらすシグナル分子として作用することが分かっている。

しかしながら、長期間にわたる LCFA の摂取は体脂肪を蓄積させ、インスリン抵抗性を引き起こすという問題点を有する (Han et al., 1997)。一方で、LCFA よりも炭素数の少ない中鎖脂肪酸 (MCFA; medium-chain fatty acid) は体脂肪を蓄積させない特性を有する (Bach and Babayan, 1982)。MCFA が体脂肪を蓄積させない理由として、LCFA と異なる消化吸収および代謝経路を経ることが挙げられる (Bach and Babayan, 1982)。MCFA は LCFA よりも分子量が小さいため、小腸上皮細胞に容易に吸収され、遊離脂肪酸 (FFA; free fatty acid) として門脈を経て肝臓へ運ばれて、肝臓や骨格筋において速やかにエネルギー源として利用される。このように MCFA も骨格筋へ取り込まれることから、MCFA は LCFA と同様に骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させるシグナル分子として作用する可能性が考えられる。しかしながら、MCFA による骨格筋のミトコンドリア生合成に対する作用についてはこれまでほとんど報告されていない。さらに、MCFA による転写関連因子に対する作用についても不明であり、PPARs に対する MCFA の結合の有無に関しても明らかとなっていない。

そこで本研究では、MCFA が LCFA と同様に骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させ、その機序に PPARs が関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、MCFA による骨格筋のミトコンドリアの変化を組織および細胞レベルで検証し、さらに PPARs に対する MCFA の結合の有無を検証した。

## II. 先行研究

脂質は細胞膜の主要な構成因子として生命を包み、外界との境界を定めている重要な物質である。過去十数年間の研究の発展によって、脂質が単に膜の構成成分ではなく、脂質は固有の役割をもっていることが明らかになりつつある。脂質の機能とは、第一にタンパク質および糖質と並ぶ三大栄養素の一つであり、効率の良いエネルギー源として利用される。第二に脂質は細胞膜における主要の構成成分として機能する。そして近年、脂質がシグナル分子として遺伝子発現を誘導することが新たな脂質の第三機能として注目されている。

### 1. 脂肪酸

#### A. 構造と物性

生体内には様々な脂質分子が存在するが、その基本成分や前駆体としての役割を果たしているのが脂肪酸である。脂肪酸はその構造の違いから多様性に富み、機能的にも非常に多彩である。脂質の多様性は含まれる脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度、極性基の種類およびリン酸化などの化学修飾の組み合わせによって生み出される。中性脂肪 (TG; triglyceride) はグリセロールと脂肪酸がエステル結合した構造を有する。脂肪酸は長鎖炭化水素の一価のカルボン酸である。脂肪酸は炭素鎖に二重結合あるいは三重結合を有さない飽和脂肪酸 (SFA; saturated fatty acid) と、これらの結合を有する不飽和脂肪酸 (UFA; unsaturated fatty acid) に分類される。さらに、不飽和脂肪酸は二重結合を 1 つ有する一価不飽和脂肪酸 (MUFA; monounsaturated fatty acid) と二重結合を 2 つ以上有する多価不飽和脂肪酸 (PUFA; polyunsaturated fatty acid) に分類される。脂肪酸は炭素

の鎖長によっても分類され、炭素数 2 ~ 6 個の脂肪酸を短鎖脂肪酸 (SCFA; short-chain fatty acid)、炭素数 8 ~ 12 個の脂肪酸を MCFA、さらに炭素数 14 個以上の脂肪酸を LCFA の 3 種類に分類される。LCFA は主として動物油脂に豊富に含まれている。一方で、MCFA は動物油脂にはほとんど含まれず、ココナツ油脂 (5 ~ 10%) や牛乳や母乳 (3 ~ 5%) などに豊富に含まれている (Bach et al., 1996)。MCFA は 1960 年代頃から未熟児や慢性腎不全患者のエネルギー補給、手術前や手術後の栄養補給に利用されるなど、医療の分野において非常に重要な役割を果たしてきた。

MCFA であるオクタン酸 (C8:0)、デカン酸 (C10:0) およびドデカン酸 (C12:0) の融点はそれぞれ 16.7°C、31.3°C および 44.2°C であり、LCFA であるパルミチン酸 (C16:0) の融点 63.1°C よりも低い (Babayan, 1968)。一般的に脂質は水に対して不溶性であるが、MCFA は水溶性を示す (Bach and Babayan, 1982)。Livesey et al. (1988) によって、パルミチン酸のエネルギー量は 9.36 kcal/g であるが、オクタン酸のエネルギー量は 7.97 kcal/g であることが報告されている。

## B. 長鎖脂肪酸の消化吸収と代謝

一般の食用油に用いられる植物油および動物油の脂肪酸の多くは LCFA である。LCFA からなる長鎖トリアシルグリセロール (LCT; long-chain triacyl glycerol) は、口腔内において舌リパーゼによる加水分解によって LCT の 3 位が分解されて 1, 2-ジアシルグリセロール (DAG; diacylglycerol) となる (McDonald et al., 1980; Mattson and Volpenhein, 1962)。しかしながらこの分解は少量であることから、その大部分がトリアシルグリセロールの構造で胃に到達する (Small, 1991)。その後 LCT

は幽門を通過して、十二指腸へ輸送される。十二指腸において LCT は腓リパーゼによって加水分解を受ける。腓リパーゼは特異性を有しており、LCT は 1 位と 3 位のみ腓リパーゼによって分解される。従って、LCT は小腸内において腓リパーゼによって 2 つの遊離脂肪酸 (FFA; free fatty acid) と 2 位モノグリセリドに分解される (Mattson and Volpenhein, 1962)。分解後、FFA と 2 位モノグリセリドは消化液中の胆汁酸とミセルを形成する。一般に脂溶性成分 (脂肪酸、TG、リン脂質およびコレステロール等) はこの胆汁酸ミセルを形成することが重要であり、胆汁酸ミセルに溶解されない脂質成分は小腸において吸収されない (Mattson and Volpenhein, 1962)。胆汁酸ミセルの形で小腸微柔毛に輸送された脂質成分は小腸上部の空腸において吸収されるが、胆汁酸自体は吸収されずに脂質成分のみが吸収される。このような経路で小腸上皮細胞に吸収された脂肪酸とモノグリセリドは、再びトリアシルグリセロールに再合成する。この場合においても、1 位および 3 位に FFA が結合するため 2 位の脂肪酸はその結合位置が保持される (Mattson and Volpenhein, 1962)。従って、トリアシルグリセロールは小腸膜を通過するために分解されるが、体内において再びトリアシルグリセロールとして再合成されて輸送される。再合成されたトリアシルグリセロールはコレステロールやリン脂質と共にカイロミクロンを形成する (Hamilton et al., 1983)。このカイロミクロンの形態のままリンパ管を通過して鎖骨下静脈内へ運ばれる。このようにして血液中に輸送されたトリアシルグリセロールは全身を巡り、リポプロテインリパーゼ (LPL; lipoprotein lipase) によって必要に応じ分解されて骨格筋や脂肪組織等に蓄積される。また、エネルギー源として必要な場合に各組織に蓄積されているトリアシルグリセロールが  $\beta$  酸化を受けて、最終的に二酸化炭素と水に分解され、ATP (adenosine

triphosphate) が再合成される。

### C. 中鎖脂肪酸の消化吸収と代謝

1951 年に Bloom et al. (1951) が放射線ラベルした各種脂肪酸をラットに投与した際、炭素数 12 以下の MCFA が門脈中に存在することを発見したことが MCFA 研究の始まりである。その後、ヒトを対象として MCFA 摂取実験が行われ、Greenberger et al. (1966) によって MCFA の消化吸収に関する基礎研究が行われた。炭素数 8~12 の MCFA と炭素数 14 以上の LCFA の消化吸収経路は大きく異なっている (Bach et al., 1996, 1982; Greenberger et al., 1966)。中鎖トリアシルグリセロール (MCT; medium-chain triacylglycerol) は摂取後、口腔内において舌リパーゼによって分解される。その分解量は LCT と比較すると非常に多いことが分かっている (Greenberger et al., 1966)。その後、胃内へ輸送された MCT は胃リパーゼや胃酸によって加水分解を受けて、大部分の MCT がグリセロールと 3 つの MCFA に分解される。したがって、十二指腸に到達した際、MCT の殆どが MCFA の形として存在することから、胰リパーゼによる分解を必要としない。また、MCFA は水溶性を示すことから、胆汁酸ミセルを形成する必要がない。そのため、MCFA はグルコースやアミノ酸と同様に門脈を通過して肝臓へ運ばれる (Holt, 1967)。これは MCT が LCT のように十二指腸において TG の分解を必要としないことを示しており、MCT が胰リパーゼによる分解や脂質成分のキャリアである胆汁酸ミセルの形成を必要としないで小腸において吸収されることを意味している。LCFA よりも MCFA の小腸上皮細胞における吸収速度は速く、MCFA は糖質と同等の速度で吸収されることが分かっている (Bach and Babayan., 1982)。そのため、これまで消化吸収性の劣る術後患者や消化



吸収機能障害患者の重要なエネルギー源として MCT は利用されてきた。

門脈を通過して肝臓に到達した MCFA は  $\beta$  酸化を受けてエネルギー源として利用され、最終的には二酸化炭素と水に分解されるが (Bach et al., 1996)、代謝においても MCFA と LCFA とでは大きく異なった経路を経る。MCFA は細胞内のミトコンドリアへ移行する際にカルニチンを必要としない。LCFA がミトコンドリアマトリクスへ移行して酸化されるためにはミトコンドリア外膜と内膜に局在するカルニチンパルミトイル転移酵素 (CPT; carnitine palmitoyltransferase) と CoA 化された LCFA である LCFA アシル CoA との結合を必要とする。しかしながら、MCFA はこれらの輸送系の結合を必要としないでミトコンドリアへ取り込まれる。そのため、MCFA は  $\beta$  酸化へ移行する速度が LCFA に比べて極めて早いことが分かっている (Metges and Wolfram, 1991)。MCFA は MCFA アシル CoA に代謝された後、ミトコンドリアマトリクスにおける  $\beta$  酸化によってアセチル CoA へ代謝される (Bach et al., 1996)。酸化されなかったアセチル CoA はケトン体へ変換されて血中へ運ばれ、骨格筋、心臓や脳などへ取り込まれる (Bach et al., 1996; Pi-Sunyer et al., 1969)。アセチル CoA へ変換されなかった一部の MCFA は骨格筋および脂肪等へ MCFA として取り込まれてエネルギー源として利用される (Bach et al., 1996)。

#### D. 中鎖脂肪酸摂取の効果

##### a. 熱産生効果

MCFA は LCFA と比較して酸素消費量および二酸化炭素排泄量から算出される食事誘発性体熱産生 (DIT; diet-induced thermogenesis) が高いことが分かっている (Noguchi and Takeuchi, 2002)。ヒトにおいて Kasai et al. (2002) は、成人 8 名に MCT 5g または 10g をそれぞれ単回摂取させた

ところ、食後 6 時間までの DIT 総和値が LCT 摂取群よりも MCT 摂取群において有意に増大したことを確認している。このような MCFA と LCFA の DIT の違いが生じる理由として摂取後の消化、吸収、輸送および貯蔵によるエネルギー消費が MCFA と LCFA と異なるためであると考えられている (Noguchi and Takeuchi, 2002)。LCFA はリンパ管を経て末梢組織へ輸送して、必要に応じて LPL により脂肪酸に分解される。その後、脂肪組織等に貯蔵されるため LCFA による熱産生は極めて少ない。一方で、MCFA は MCFA アシル CoA からアセチル CoA へ  $\beta$  酸化される過程に続き、二酸化炭素またはケトン体さらに *denovo* 合成脂肪への酸化および分解・変換される割合が高いため、MCFA の代謝エネルギー量は LCFA に比べて高いことが分かっている (Seaton et al., 1986)。

#### b. 体脂肪抑制効果

いくつかの研究によって、MCFA は LCFA と比較すると体脂肪を蓄積させにくいことが報告されている (Malapaka et al., 2012; Noguchi and Takeuchi, 2002; Tsuji et al., 2001; Papamandjaris et al., 1998)。Tsuji et al. (2001) は健常者を対象として、12 週間にわたり MCFA を 9.2 g (MCT: 10 g) 摂取させたところ、コントロールの植物油摂取群よりも MCFA 摂取群において体脂肪蓄積の抑制効果を有することを確認した。ラットに MCT を 8 週間摂餌させたところ、動物油摂餌群 (主に LCFA を含む) と比較して MCT 摂餌群において体重、副睾丸脂肪重量、腎周囲脂肪重量および皮下脂肪重量の低下がみられた (Noguchi and Takeuchi, 2002)。摂取後のエネルギー消費量は LCT よりも MCT において高いため、MCT は LCT よりもエネルギー源として利用されやすい。このことが MCT による体脂肪蓄積の抑制要因として考えられている (Noguchi and Takeuchi,

2002; Seaton et al., 1986) 。さらに、Malapaka et al. (2012) は 3T3-L1 脂肪細胞に MCFA であるオクタン酸を 300  $\mu$ M 添加したところ、LCFA であるオレイン酸よりも脂質生成が抑制されたことを報告した (Figure II-1) 。さらに彼らは、オクタン酸添加によって 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪生成に関わる遺伝子である CEBP (CCAAT/enhancer binding protein) の発現量がオレイン酸添加よりも低かったことを示している (Malapaka et al., 2012) 。これらの知見から、MCFA は LCFA よりも体脂肪を蓄積させにくい理由として、生体内において MCFA のエネルギー消費量が高いだけでなく、脂肪細胞において脂肪生成関連遺伝子の発現抑制に MCFA が作用していることも挙げられる。しかしながら、MCFA による脂肪細胞における脂肪生成関連遺伝子の発現機序に関しては未だ不明な点も残されており、どのような機序で MCFA が脂肪生成関連遺伝子を制御しているのかについては今後、詳細な検証を必要とする。

## 2. 骨格筋における脂質代謝

### A. 脂肪酸の輸送と酸化

各組織に蓄積されている TG は FFA として血中に放出される。血中において FFA はアルブミンと結合し、骨格筋をはじめとする各組織へ輸送されて、エネルギー源として利用される。FFA は筋細胞膜に局在する脂肪酸トランスポーターである細胞膜脂肪酸結合タンパク質 (FABPpm; plasma membrane fatty acid binding protein)、脂肪酸輸送担体/CD36 (FAT/CD36; fatty acid translocase/CD36) または脂肪酸輸送タンパク質 (FATP; fatty acid transport protein) を介して筋細胞内へ取り込まれる (Abumrad et al., 1999)。LCFA は筋細胞質内において細胞質脂肪酸結合タンパク質 (FABPc; cytosolic fatty acid binding protein) と結合して、細胞

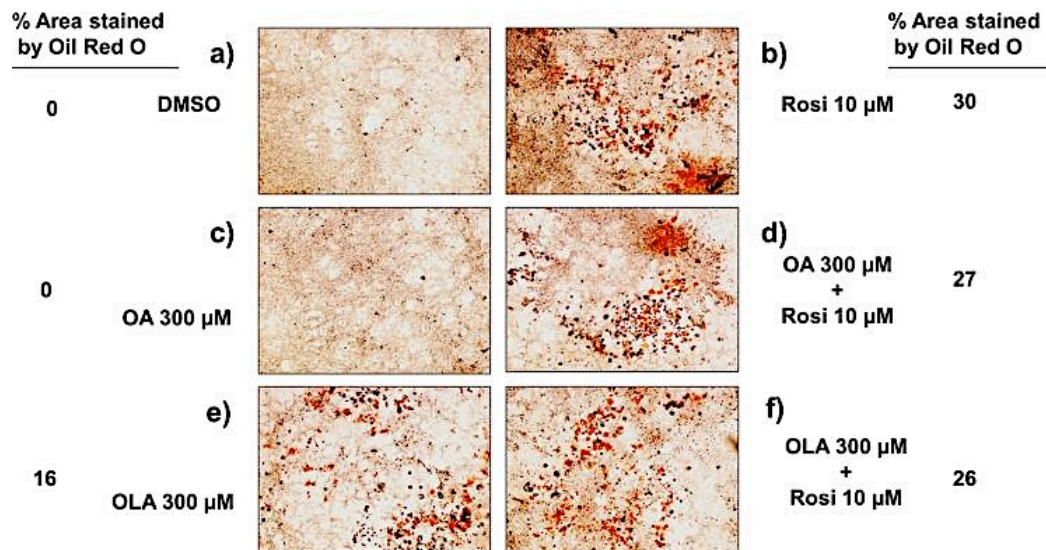


Figure II-1. 3T3-L1 adipocyte differentiation assay using OA, OLA, and Rosi (Malapaka et al., 2012). OA did not promote adipogenesis by itself, whereas OLA promotes adipocyte differentiation. OA can inhibit adipogenesis activated by rosiglitazone. Oil Red O staining of 3T3-L1 fibroblast cells after differentiating with different ligands. Treatment groups include the following: a, DMSO; b, Rosi 10  $\mu$ M; c, OA 300  $\mu$ M; d, Rosi 10  $\mu$ M + OA 300  $\mu$ M; e, OLA 300  $\mu$ M; f, Rosi 10  $\mu$ M + OLA 300  $\mu$ M. OA, octanoic acid; Rosi, rosiglitazone; OLA, oleic acid.

質内を移動し、ミトコンドリアへ輸送される (Abumrad et al., 1999)。その後、LCFA はミトコンドリア外膜にあるアシル CoA シンターゼによって長鎖アシル CoA (coenzyme A) へ変換される。長鎖アシル CoA はミトコンドリア内膜を通過できないため、カルニチンパルミトイル転移酵素 (CPT; carnitine palmitoyltransferase) 系を介してミトコンドリア膜を通過する (Abumrad et al., 1999)。長鎖アシル CoA はミトコンドリア外膜に局在する CPTI によってアシルカルニチンへ変換され、アシルカルニチンはミトコンドリア外膜を通過した後、ミトコンドリア内膜に存在する CPTII によって再びアシル CoA へ変換される。ミトコンドリア内へ取り込まれたアシル CoA は $\beta$ -HAD によって $\beta$ 酸化され、アセチル CoA を産生する。その後アセチル CoA は TCA (tricarboxylic acid) 回路に入り、電子伝達系によって最終的に二酸化炭素と水を産生して、ATP が再合成される (Doenst et al., 2013; Figure II-2)。グルコース 1 分子が酸化された場合、再合成される ATP 産生量は 30 分子であるのに対して、パルミチン酸の ATP 産生量は 1 分子当たり 131 分子、オレイン酸の ATP 産生量は 146 分子である (Brand, 2005)。

LCFA は不溶性の物性を示すため、脂肪酸輸送タンパク質との結合や膜輸送担体を介さなければ細胞内を移動したり、膜を通過したりすることはできない (Abumrad et al., 1999)。一方、MCFA は水溶性の物性を示すことから、FABP や CPT 等の結合タンパク質や輸送担体を介さずに細胞内の移動や膜輸送を可能とする (Bach et al., 1996)。

## B. 脂肪酸結合タンパク質

LCFA のような不溶性の脂肪酸は血漿中ではアルブミンと結合し、細胞内では FABPc と結合して細胞質内を移動する (Abumrad et al., 1999)。

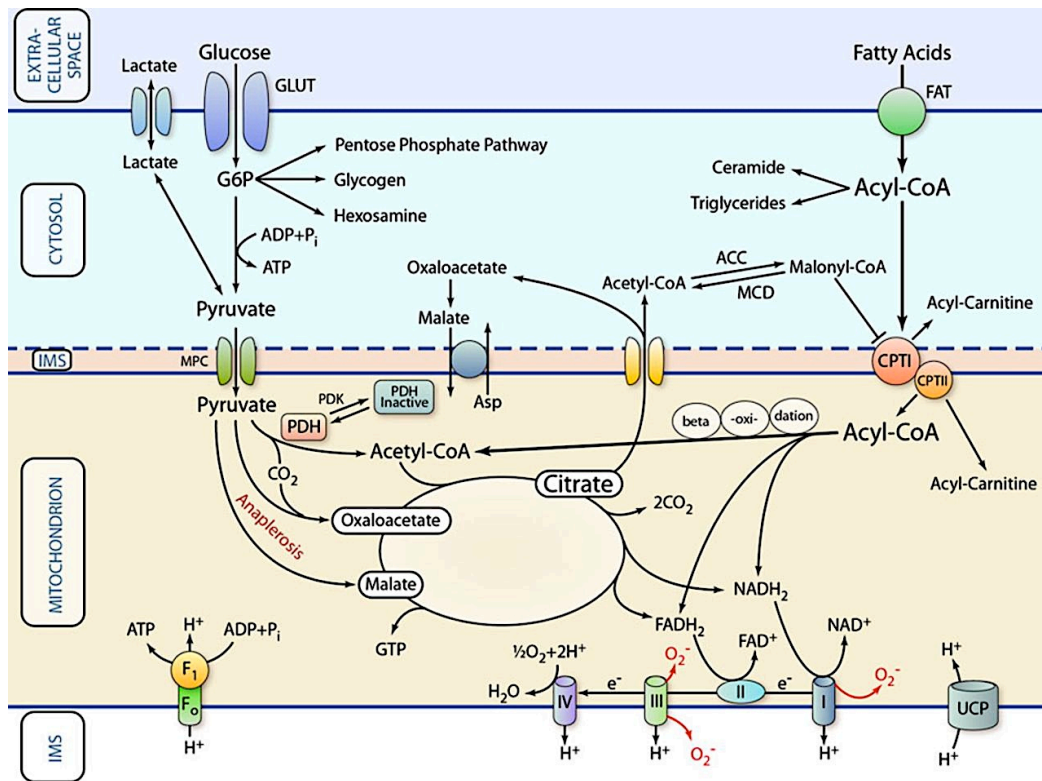


Figure II-2. Schematic representation of classic pathways of cardiac metabolism (Doenst et al., 2013). Substrates are transported across the extracellular membrane into the cytosol and are metabolized in various ways. ACC, acetyl-CoA carboxylase; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; ASP, aspartic acid; CPT, carnitine palmitoyltransferase; GTP, guanosine triphosphate; FAT, fatty acid transporter; G6P, glucose 6-phosphate; GLUT, glucose transporter; IMS, mitochondrial intermembrane space; MCD, malonyl-CoA decarboxylase; MPC, mitochondrial pyruvate carrier; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; UCP, uncoupling protein.

脂肪酸結合タンパク質として、細胞膜に局在している FABPm (約 43 kDa) と、細胞質に局在する FABPc (約 14 ~ 15 kDa) が同定されている (Glatz et al., 2003)。さらに、FABPc には肝臓型-FABP (Liver-FABP; L-FABP)、小腸型-FABP (Intestinal-FABP; I-FABP)、心臓型-FABP (Heart-FABP; H-FABP)、脂肪組織型-FABP (Adipocyte-FABP; A-FABP)、睾丸型-FABP (Testis-FABP; T-FABP)、皮膚型-FABP (Epidermal-FABP; E-FABP)、回腸型-FABP (Ileal-FABP; Il-FABP)、脳型-FABP (Brain-FABP; B-FABP)、末梢神経型-FABP (Myelin-FABP; M-FABP) の 9 種類のアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームは類似の構造を有し、一つのファミリーとして同定されている。骨格筋に発現しているのは H-FABP である (Neufer et al., 1994)。一般的に FABP は通常 1 分子の LCFA と結合するが、L-FABP のみが 2 分子の LCFA と結合する (Stahl, 2004)。また、多くの FABPs は LCFA と特異的に結合するが、B-FABP のみが長鎖不飽和脂肪酸に対して特異的に結合する (Glatz et al., 2003)。

### C. PPARs

近年、核内レセプター研究の著しい発展によって、リガンド未同定の核内レセプターが多数発見され、それらの機能が明らかになりつつある。その中でも PPARs は飛躍的に研究が進んだ核内レセプターの一つであり、ステロイドホルモンやビタミン D3 等と同様に、核内ホルモンレセプタースーパーファミリーに属する。

#### a. 構造

PPARs はレチノイド X レセプター (RXR; retinoid X receptor) とヘテロ二量体を形成している。PPARs はデオキシリボ核酸 (DNA; deoxyribo

nucleic acid) 結合領域であるペルオキシソーム増殖応答エレメント (PPRE; peroxisome proliferator responsive element) と結合し、その下流の遺伝子発現を制御する。PPRE は、5'-AGGTCA-3' 配列が 1 bp を隔てた直列 2 回繰り返し配列 (DR1) と 2 bp を隔てた直列 2 回繰り返し配列 (DR2) から構成される。PPARs の構造は他の核内受容体と類似しており、N 末端側から順に機能ドメイン (A/B ~ E/F) に区分される (Rosen and Spiegelman, 2001; Yang et al., 2014, Figure II-3)。PPARs は N 末端にリガンド非依存性の転写制御ドメイン (AF1) を持つ A/B 領域や Zn フィンガーモチーフを有している。さらに PPARs は標的遺伝子の PPRE と結合する DNA 結合領域 (DBD; DNA binding domain) である C 領域、立体構造変化により遺伝子制御を行い、可変領域を有する D 領域、C 末端にはリガンド依存性の転写制御ドメイン (AF2) とリガンド結合領域 (LBD; ligand binding domain) を持つ E/F 領域から構成されている (Yang et al., 2014, Figure II-3)。これらの構造は PPARs に対するリガンドの結合とコリプレッサー、コアクチベーターとの相互作用によって遺伝子の発現制御を行うように構成されている。リガンド未結合状態では、PPARs に対してコリプレッサーが会合して AF2 をブロックし、PPARs の転写促進を抑制している。一方、リガンドが PPARs の LBD に結合して PPAR/RXR の heterodimer 複合体が形成されると、コリプレッサーが解離して、コアクチベーターである cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CBP) / p300 や steroid receptor co-activator 1 (SRC 1) が AF2 に結合し、転写誘導に必須な複合体形成を誘導して、転写を開始する。

#### b. リガンド



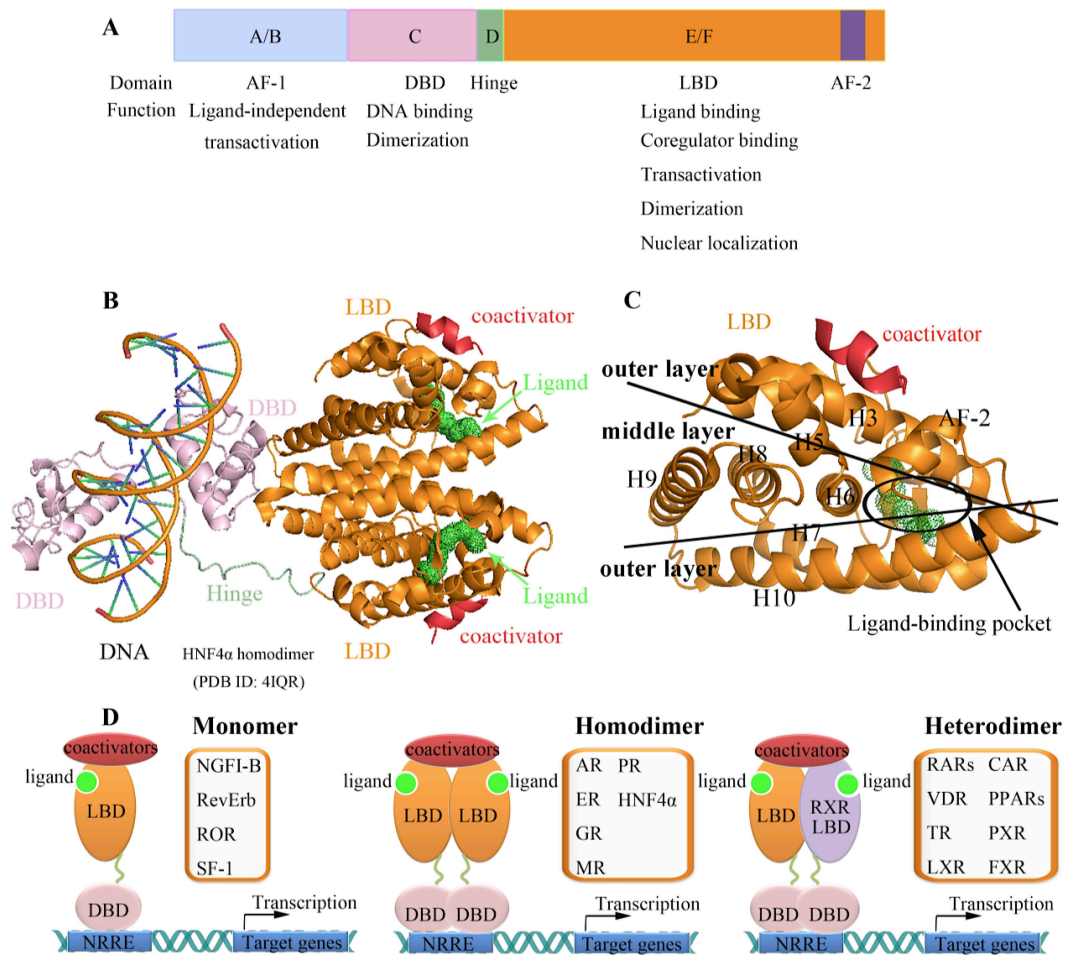


Figure II-3. Structural and functional organization of nuclear receptors (Yang et al., 2014).  
 (A) Schematic diagram for a common domain structure of NR. (B) Multi-domain structure of the HNF4α/DNA complex in cartoon representation. The crystal structure of HNF4α homodimer (PDB 4IQR) includes DBD (pink), Hinge (green), LBD (orange) in complex with response DNA sequence (left) and ligand (green dots). (C) Enlarged view of HNF4α LBD monomer, which clearly shows the three layer sandwich structure. (D) Metabolic regulation of NR. AF, activation function; DBD, DNA binding domain; LBD, ligand binding domain, NRRE, nuclear receptor response element.

Issemann et al. (1990) によって初めて、PPARs は抗高脂血症薬のクロフィブレートによって活性化されることが報告された。さらに、 $\alpha$  リノール酸、 $\gamma$  リノール酸、エイコサペンタン酸 (EPA; eicosapentaenoic acid) やアラキドン酸などの PUFA、オレイン酸やパルミチン酸といった SFA や MUFA、 $\omega$ -3 脂肪酸が PPARs のリガンドとして作用することが明らかとなった (Xu et al., 1999, Figure II-4)。Xu et al. (1999) は PPARs に対する各脂肪酸の結合をシンチレーションプロキシミティアッセイ法 (SPA; scintillation proximity assay) によって検証した結果、SFA (パルミチン酸, IC<sub>50</sub>: 7.4  $\mu$ M) よりも UFA ( $\gamma$  リノレン酸, IC<sub>50</sub>: 0.8  $\mu$ M) の方が PPAR $\alpha$  に対する結合親和性が高いことを示唆している。

PPARs のリガンド評価法として PPARE の下流にレポーター遺伝子を導入した転写活性評価方法が広く用いられている (Elbrecht et al., 2000)。この方法は既知の PPARs のアゴニストと競合させることによってアンタゴニスト活性を評価する。しかしながら、リガンド探索時にアゴニスト試験のみを行った場合、アンタゴニストを見落としてしまうという問題点も有している。また、PPARs の転写活性評価だけでなく、PPARs に対するリガンドの結合親和性を直接評価する方法も PPARs リガンド研究においては必要である。タンパク質とリガンドの結合評価の代表的な方法としては放射性ラベルを利用した方法がある (Yue et al., 2005)。しかしながら、タンパク質と結合しているリガンドと結合していないリガンドの分離操作が必要であり、操作が非常に煩雑である (Yue et al., 2005)。近年では表面プラズモン共鳴 (SPR; surface plasmon resonance) 法や等温滴定型熱量測定 (ITC; isothermal titration calorimeter) 法を用いた方法が多く用いられるようになってきている (Yang et al., 2007; Ye et al., 2006)。さらに、PPARs の結合評価に関しては時間分解蛍光共鳴エネルギー転移

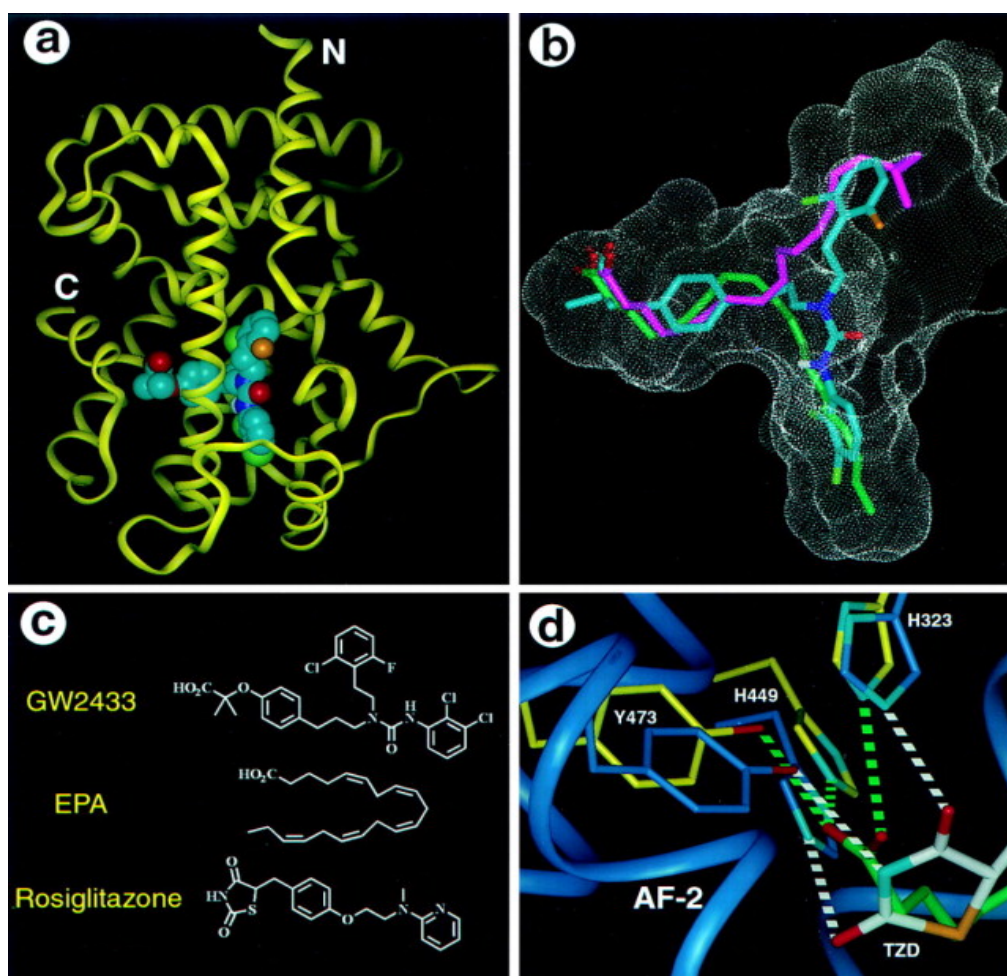


Figure II-4. The PPARδ-GW2433 cocrystal structure (Xu et al., 1999). (a) Structure of the PPARδ-GW2433 complex. The PPARδ backbone is represented by the yellow ribbon, and GW2433 is represented with sticks and is color coded as follows: carbon, cyan; oxygen, red; nitrogen, blue; green, chlorine; and orange, fluorine. (b) Superposition of the structures of GW2433 and EPA bound to PPARδ. The surface of the pocket is represented with white dots, and the compounds are color coded. (c) Chemical structures of the compounds. (d) Superposition of the TZD headgroup from the PPARγ rosiglitazone cocrystal structure with the carboxylic acid headgroup from the EPA PPARδ cocrystal structure. PPARγ (blue, carbon) and PPARδ (yellow, carbon) amino acid side chains are denoted in different colors. AF, activation function; EPA, eicosapentaenoic acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

(TR-FRET; time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 法に基づく測定も用いられてきている。

### c. アイソフォーム

PPARs には PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$  ( $\beta$ )および PPAR $\gamma$  の 3 つのアイソフォームが同定されている。PPAR $\alpha$  は 1990 年に (Issemann et al., 1990)、PPAR $\beta$  および PPAR $\gamma$  は 1992 年に (Dreyer et al., 1992) アフリカツメガエルにおいてそれらのクローニングが報告され、ヒトにおいても PPAR $\delta$  のクローニングが報告された (Schmidt et al., 1992)。PPAR $\alpha$  は肝臓、腎臓、骨格筋や心筋、副腎等の組織に発現している (Rakhshandehroo et al., 2010)。PPAR $\gamma$  は主に脂肪組織、マクロファージおよび血管平滑筋において発現している (Tai et al., 1996)。PPAR $\delta$  は全身にわたり偏在的に発現している (Evans et al., 2004)。

PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  は脂肪酸の代謝や輸送に関連する遺伝子、コレステロールや TG の代謝に関連する遺伝子の発現を制御している (Rakhshandehroo et al., 2010; Rieck and Meissner, 2008)。PPAR $\gamma$  は脂肪細胞の分化誘導に関する遺伝子発現を制御しており、脂肪細胞において脂質生成を亢進させる (Tai et al., 1996)。Gan et al. (2011) によって PPAR $\alpha$  と PPAR $\delta$  が骨格筋において発現していることが確認されている。Tanaka et al. (2003) はマウスに PPAR $\delta$  のアゴニストである GW501516 を 8 週間にわたり経口投与した結果、コントロールと比較して GW501516 投与群において骨格筋における CPTI や 3-HAD 等の  $\beta$  酸化関連遺伝子の発現量が増加して、パルミチン酸の酸化量も増加したことを報告した。さらに、これらの遺伝子の発現は PPAR $\alpha$  や PPAR $\gamma$  のアゴニストでは生じないことも示されていることから (Tanaka et al., 2003)、骨格筋において

PPAR $\delta$  がミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御していると考えられている。さらに、Wang et al. (2003) は、骨格筋特異的に PPAR $\delta$  を過剰発現させたマウスにおいてミトコンドリア関連タンパク質やその mRNA (messenger ribo nucleic acid) が野生型マウスと比較して有意に増加して、さらに骨格筋の遅筋化が生じたことを報告している (Figure II-5)。近年、Gan et al. (2013) はマウス骨格筋特異的に PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  を過剰発現させたところ、PPAR $\delta$  を過剰発現させた筋において遅筋化が生じたことを免疫染色法と mRNA の検出によって示唆し、さらに運動時間も延長されたことを示した (Figure II-6)。一方で、PPAR $\alpha$  を過剰発現させた筋においては遅筋線維が減少して運動時間も短縮した。これらの知見は、骨格筋においては PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  が発現しているが、ミトコンドリア関連遺伝子や遅筋線維関連遺伝子の発現に対して PPAR $\alpha$  ではなく PPAR $\delta$  が制御していることを示している。

### 3. ミトコンドリア

#### A. 構造と機能

ミトコンドリアは外膜および内膜の2重膜によって形成されている細胞内小器官である。ミトコンドリア内膜の内部にはマトリクスと呼ばれるひだ構造 (クリステ) を形成している。クリステにはATP再合成のための必要な呼吸鎖に関わるタンパク質が局在している。細胞質内で行われる解糖やミトコンドリア内で行われる $\beta$ 酸化によって合成されるアセチルCoAはTCA回路に入り、電子伝達系によって最終的にATPとH<sub>2</sub>Oを産生する (Figure II-2)。骨格筋細胞内には、筋線維鞘の近くに存在する筋線維鞘下 (SS; subsarcolemmal) ミトコンドリアと筋原線維間に存在する筋原線維間 (IMF; intermyofibrillar) ミトコンドリアの2種類のミトコンドリアが

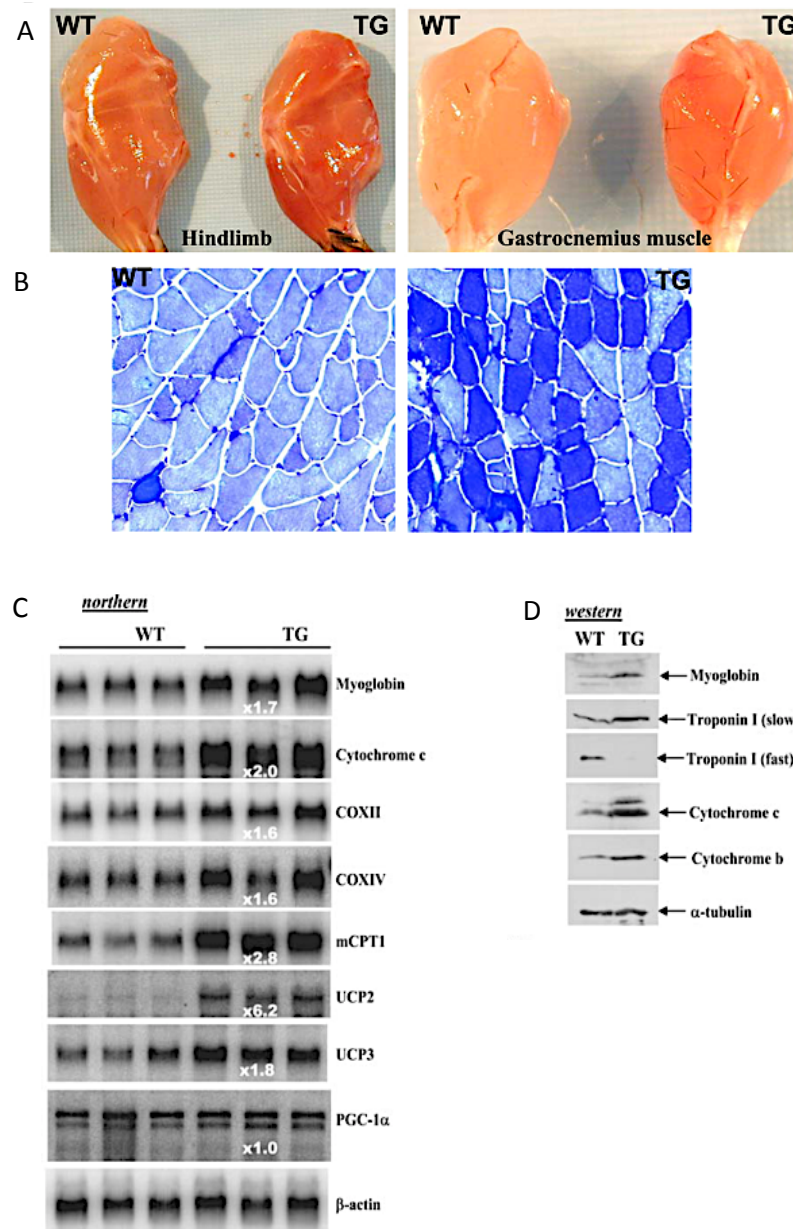


Figure II-5. Increased oxidative type I fibers and mitochondrial biogenesis in the PPAR $\delta$  transgenic mice (Wang et al., 2003). (A) Muscles in transgenic (TG) mice are redder than those in wild-type mice (WT). (B) Metachromatic staining of the type II plantaris muscle. Type I fibers are stained dark blue. (C) Total RNA prepared from gastrocnemius muscle of TG and WT littermates was probed with indicated probes. (D) Western blot analysis of muscle fiber markers and mitochondrial components in TG and WT. COX, cytochrome c oxidase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator; UCP, uncoupling protein; TG, transgenic; WT, wild-type.



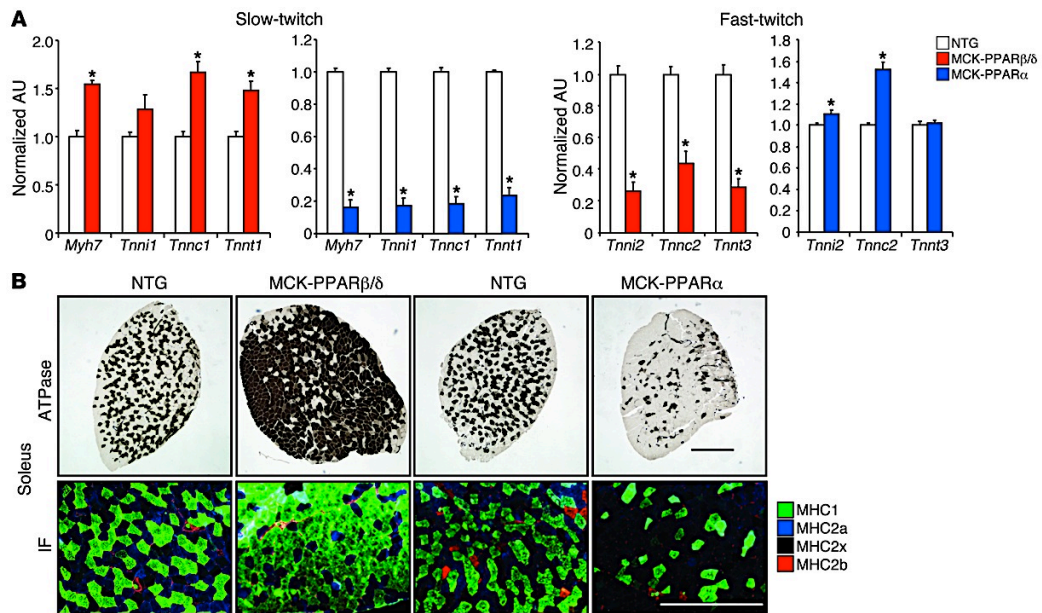


Figure II-6. PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\alpha$  regulate opposing muscle fiber-type programs (Gan et al., 2013). Expression of the slow-twitch myosin *Myh7* and representative slow/fast-twitch troponin genes (qRT-PCR) in soleus muscle from indicated genotypes ( $n = 5-13$  mice per group). (B) Cross-section of soleus muscle from 3- to 4-month-old male Muscle creatine kinase (MCK)-PPAR $\beta/\delta$  and MCK-PPAR $\alpha$  mice ( $n = 5$  mice per group) stained for myosin I ATPase activity as well as MHC fiber typing by immunofluorescence (IF) of soleus of indicated genotypes (MHC1 [green], MHC2a [blue], MHC2b [red], and MHC2x [unstained]). Scale bar: 500  $\mu\text{m}$ . MHC, myosine heavy chain; Myh, myosin heavy chain gene; NTG, non-transgenic; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Tnn, troponin.

存在している。そのうち、SSミトコンドリアは骨格筋に局在するミトコンドリアの10～15%の割合を占めている（Krieger et al., 1980）。

## B. 増殖機序

### a. mitochondria DNA と遺伝子発現調節

ミトコンドリアには核遺伝子と異なる固有の遺伝子であるmitochondria DNA (mtDNA) を有している。mtDNAと核DNAの構造は異なり、mtDNAは環状2重鎖DNAとして存在する。mtDNAは多くのリボ核酸（RNA; ribonucleic acid）をコードしている重鎖と軽鎖から成る。ヒトにおけるmtDNAは16569塩基対から構成されており、核DNAと比較すると極めて小さい。一つのミトコンドリアには数個のmtDNAが収納されている。mtDNAは2種類のリボゾームRNA、22種類のトランスファーRNAおよび13種類のタンパク質をコードしている。また、mtDNAにはわずかながら遺伝子をコードしていない配列を有しており、この領域はD-loopと呼ばれている。重鎖DNAの転写は、重鎖プロモーター（HSP; H-strand promoter）領域内の転写開始点にミトコンドリアRNAポリメラーゼが結合することによって開始する。軽鎖DNAの転写も、軽鎖プロモーター領域の転写開始点にRNAポリメラーゼが結合することによって開始する。重鎖DNAおよび軽鎖DNAともに、それぞれのプロモーター領域の上流において転写調節因子の結合部位が存在している。その部位に転写調節因子であるミトコンドリア転写因子A（Tfam; mitochondrial transcription factor）が結合して、RNAポリメラーゼと協働することによってmtDNAにコードされているミトコンドリア関連遺伝子の転写が誘導される（Figure II-7）。

### b. nucleus DNA と遺伝子発現調節



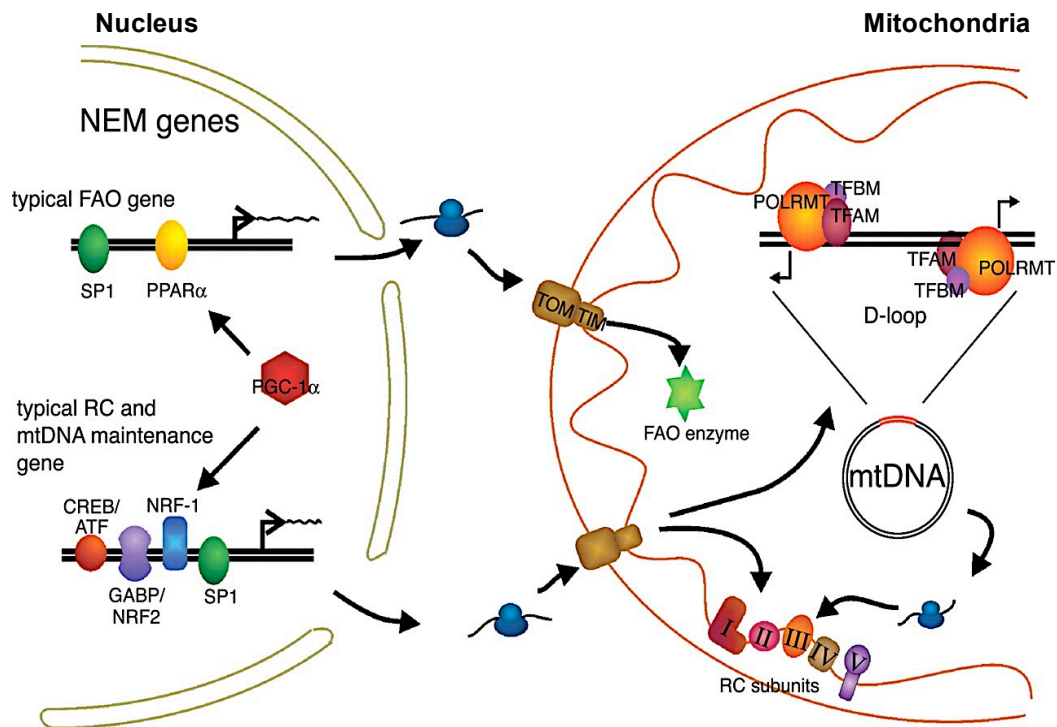


Figure II-7. Involvement of two genetic systems in cardiac mitochondrial biogenesis (Goffart et al., 2004). The NEM genes were regulated by different DNA-binding transcription factors, and are imported into the organelles via TOM and TIM. After import, nuclear encoded subunits are assembled with the mtDNA encoded subunits. TFAM indeed enhances mtDNA transcription by mitochondrial RNA polymerase in a promoter-specific TFBM. CREB/ATF, cAMP response element binding protein/Activating transcription factors; FAO, fatty acid oxidation; GABP/NRF, GA-binding protein/nuclear respiratory factor; NEM, nucleus mitochondria; PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SP1, RC, respiratory chain; TFBM, transcription factor B; TIM, translocator complexes of the outer membrane; TOM, translocator complexes of the outer membrane.

一般的に、タンパク質の合成は核に存在するDNAからmRNAを作成すること（転写）から始まる。転写は、転写因子と呼ばれるタンパク質が遺伝子上流の転写開始を制御している領域に結合することによって開始する。前項で述べたように、mtDNAには13個のタンパク質の遺伝子しかコードされていない。そのため、ミトコンドリアを構成するために必要な遺伝子の大部分は核DNAにコードされている。mtDNAの遺伝子発現を制御しているTfamの遺伝子もmtDNAではなく、核DNAに存在する。したがって、mtDNAに存在する遺伝子と核DNAに存在する遺伝子との協調によってミトコンドリア遺伝子発現が制御されている。Chau et al. (1992) によってNuclear respiratory factor-1 (NRF-1) と呼ばれる転写因子が、核DNAに存在するミトコンドリアの遺伝子発現に対して重要な役割を担っていることが明らかとなった。NRF-1はcytochrome c、ATP synthase  $\gamma$  subunitおよび他のミトコンドリア関連遺伝子のプロモーター部位に結合することによってその転写を誘導する (Chau et al., 1992)。これはミトコンドリアを構成している様々な遺伝子が同じ機序によって制御され、それらの発現量のバランスが保たれていることを示している (Chau et al., 1992)。また、NRF-1はmtDNAにコードされているミトコンドリア遺伝子の転写に関与するTfamの転写を誘導する (Virbasius et al., 1993)。したがって、NRF-1が核DNAにコードされている多くのミトコンドリア関連遺伝子の転写を誘導するだけでなく、Tfam遺伝子の発現量の増加を介してmtDNAにコードされている遺伝子の発現も誘導されることで、協調したミトコンドリア関連遺伝子の発現調節が行われていると考えられている (Figure II-7)。

### c. PGC-1 $\alpha$

褐色脂肪細胞は骨格筋と同様に多くのミトコンドリアが局在している

細胞である。白色脂肪細胞がエネルギー貯蔵として作用しているのに対して、褐色脂肪細胞は熱産生として作用している。そのため、褐色脂肪細胞には熱産生の役割を担っている脱共役タンパク質-1 (uncoupling protein-1; UCP-1) が特異的に発現している (Enerback et al., 1997)。UCP-1のプロモーター部位にPPAR $\gamma$ の結合部位が存在していることが分かっている。PPAR $\gamma$ のアゴニストをラットに投与した結果、褐色脂肪細胞の肥大化が生じたことから、PPAR $\gamma$ は褐色脂肪細胞への分化に必要な転写因子であると考えられてきた (Tai et al., 1996)。Puigserver et al. (1998) は、褐色脂肪細胞において特異的に発現してPPAR $\gamma$ と相互作用する転写補助因子、peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) を発見した。彼らは前駆脂肪細胞および骨格筋細胞にPGC-1 $\alpha$ 遺伝子を導入したところ、UCP-1およびミトコンドリア関連のmRNAが増加することを示した (Puigserver et al., 1998)。さらに、Lin et al. (2002) は骨格筋特異的PGC-1 $\alpha$ 過剰発現マウスを作成したところ、そのマウスの骨格筋において野生型マウスと比較してミトコンドリア関連mRNAおよびmtDNAコピー数が増加することを示している。Xu et al. (1999) は、骨格筋細胞にPGC-1 $\alpha$ 遺伝子を導入したところ、コントロールと比較してミトコンドリア数が増加することをmtDNAコピー数の検出や電子顕微鏡観察によって示している (Figure II-8)。さらに、彼らはNRF-1 mRNA発現量もPGC-1 $\alpha$ 過剰発現によって増加したことを報告している。PGC-1 $\alpha$ はNRF-1に結合して複合体を形成することや、NRF-1の転写活性化部位を欠損したドミナンドネガティブ変異体遺伝子を骨格筋細胞に導入すると、PGC-1 $\alpha$ による転写活性が阻害され、ミトコンドリアの増加が生じなかったことを示している (Xu et al., 1999)。NRF-1はTfamの発現量を増加させ、mtDNAにコードされている遺伝子の転写を増大させる。Xu et al. (1999) によって、PGC-1 $\alpha$ 遺伝子

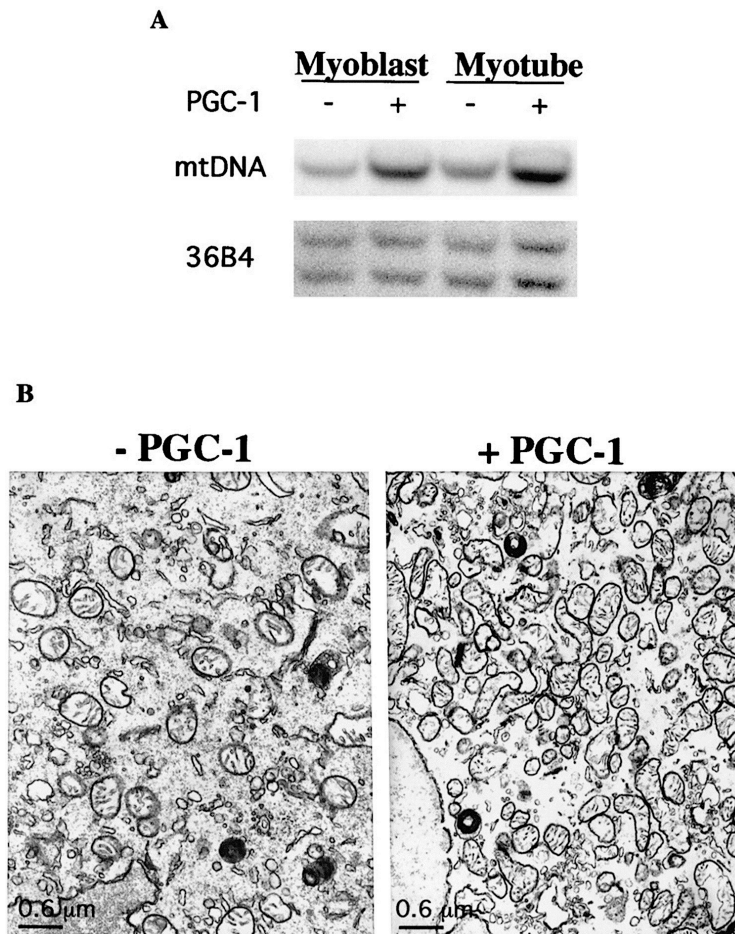


Figure II-8. PGC-1 stimulates mitochondrial DNA replication and biogenesis (Xu et al., 1999).  
 (A) Southern blot analysis of mitochondrial and genomic DNA. Total cellular DNA was isolated from C2C12 cells expressing PGC-1 and their control, in both the myoblast and myotube states. (B) Transmission electron microscopy of PGC-1 expressing myoblasts. PGC-1, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator-1.

を導入した培養細胞においてNRF-1 mRNAだけでなく、Tfam mRNA発現量を増加させることが報告されている。さらに、Wang et al. (2003) の研究ではHuman Embryo Kidney (HEK) 細胞にPGC-1 $\alpha$ およびPPAR $\delta$ を発現させて、免疫沈降法によってPPAR $\delta$ と結合しているタンパク質を検出したところ、PGC-1 $\alpha$ がPPAR $\delta$ と結合することを示唆している。以上の先行研究より、PGC-1 $\alpha$ はNRF-1およびTfam遺伝子の発現を誘導して、さらにNRF-1やPPAR $\delta$ と複合体を形成してこれらの転写を活性化することによって包括的にミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御していると考えられている。

#### d. 持久的トレーニング

持久的トレーニングによって骨格筋のミトコンドリア含量が増加することが1976年に初めて報告された(Holloszy and Booth, 1976)。Holloszy and Booth (1976) は、持久的トレーニングを負荷したラットの骨格筋においてミトコンドリア酵素活性が非トレーニングと比較して約2倍に増加したことを報告している。Wibom et al. (1992) は6週間の持久的トレーニング後、外側広筋においてATP合成速度がトレーニング前と比較して約90%上昇したことを報告している。ミトコンドリア生合成において重要な役割を担っているPGC-1 $\alpha$ 、NRF-1やPPAR $\delta$ といった転写因子や転写補助因子は、身体運動を行うことによってこれらの発現量の増加を引き起こす。Murakami et al. (1998) はラットに90分間の一過性トレッドミル走を行わせたところ、運動終了6時間後において、骨格筋のNRF-1 mRNAが運動前と比較して有意に増加したことを報告している。また、一過性の運動や持久的トレーニングによって骨格筋におけるPGC-1 $\alpha$  mRNAの発現量が増加する(Baar, 2004)。PGC-1 $\alpha$ はNRF-1を増加させ、

さらに NRF-1 と結合することによってその転写活性を亢進させる。したがって、運動による骨格筋ミトコンドリア生合成には PGC-1 $\alpha$  や NRF-1 といった転写因子群の発現量の増加が関与している。さらに、Luquet et al. (2003) によって、マウスに 6 週間の水泳運動を行わせたところ非運動群と比較して PPAR $\delta$  発現量が増加させることが報告されている。また、彼らは骨格筋特異的に PPRA $\delta$  を過剰発現させたマウスの骨格筋において、野生型マウスと比較してミトコンドリアタンパク質が増加したことを示している (Luquet et al., 2003)。Wang et al. (2003) は、骨格筋特異的に PPAR $\delta$  を過剰発現させたマウスにおいてミトコンドリア関連タンパク質やその mRNA が野生型マウスと比較して有意に増加して、さらに骨格筋の遅筋化が生じたことを報告している (Figure II-5)。

#### e. 脂質食

脂質食摂取は普通食摂取と比較して骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる。Miller et al. (1984) によって、5 週間の高脂肪食は普通食と比較して骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性を増大させ、疲労困憊に至るまでの運動時間を延長させたことが報告された。Turner et al. (2007) によって 5 週間の脂質食摂取は、普通食と比較して骨格筋のミトコンドリア関連タンパク質および脂肪酸酸化量を増加させることが報告された。また、Garcia-Roves et al. (2007) は 4 週間にわたる高脂肪食摂取とヘパリン投与によって上昇した FFA が、骨格筋ミトコンドリア関連酵素の発現量を増加させたことを報告している。彼らの結果から、脂質食による血中 FFA 濃度の上昇が骨格筋ミトコンドリア生合成を誘発していると考えられている。脂肪酸によって活性化される転写因子として、PPARs が知られている (Xu et al., 1999)。骨格筋においては主に PPAR $\delta$  が、次

いで PPAR $\alpha$  が発現している (Stephenson et al., 2012)。C2C12 骨格筋培養細胞に PPAR $\delta$  のアゴニストである GW501516 を添加するとミトコンドリア関連タンパク質が増加することが Hondares et al. (2007) によって報告されている。さらに、Hancock et al. (2009) は、高脂肪食の摂取によって骨格筋の PPAR $\delta$  タンパク質が普通食と比較して増加したことを報告している。したがって、高脂肪食による骨格筋のミトコンドリア関連タンパク質の増加は PPAR $\delta$  によって誘導されていることが示唆されている。さらに、彼らは PGC-1 $\alpha$  タンパク質も普通食摂取と比較して高脂肪食摂取によって増加することを報告している (Figure II-9)。彼らは高脂肪食による PGC-1 $\alpha$  タンパク質の増加は PGC-1 $\alpha$  mRNA 発現量の変化を伴わないことも示しており、高脂肪食は PGC-1 $\alpha$  の転写段階ではなく、翻訳段階で活性化している、もしくは PGC-1 $\alpha$  のタンパク質の安定化をもたらしている可能性を示唆している (Hancock et al., 2009)。

Simi et al. (1991) は持久的トレーニングと脂質食摂取を 4 週間にわたり組み合わせて行った結果、骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性が普通食摂取のみと比較して加算的に亢進することを報告している。また、Fillmore et al. (2010) は AICAR (AICA riboside) と脂質食を 6 週間にわたり摂取させた結果、骨格筋における PGC-1 $\alpha$  および cytochrome c の発現量が加算的に増加することを報告している。Hancock et al. (2009) によって、運動は骨格筋の PGC-1 $\alpha$  遺伝子を転写レベルで活性化することが示唆されている。したがって、運動と脂質食の組み合わせによってミトコンドリアが加算的に増加するのは、PGC-1 $\alpha$  の発現機序が双方において異なっているためであると考えられている。しかしながら、運動と脂質食による異なる PGC-1 $\alpha$  の作用に対してその詳細は明らかとなっていないため、今後さらなる検証を必要とする。

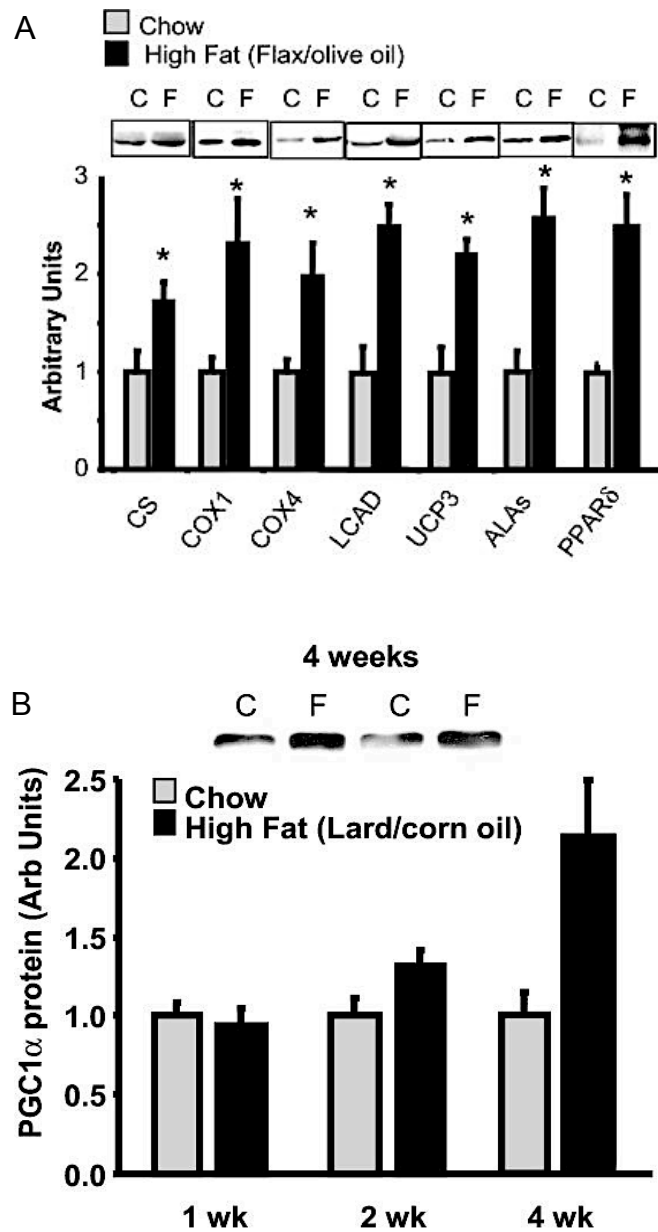


Figure II-9. A high-fat diet induces an increase in skeletal muscle mitochondria (Hancock et al., 2008). A high-fat diet induces a gradual increase in mitochondrial (A) and PGC-1 $\alpha$  (B) protein in epitrochlearis muscles of rats fed the lard/corn oil diet. Values are mean  $\pm$  SE for 6-10 muscles. \*:  $p < 0.05$ , high fat versus chow. C, control; F, high fat.



### III. 研究目的及び検討課題

LCFA(炭素数 14 個以上)は PPARs のリガンドとして機能するため(Xu et al., 1999)、LCFA の摂取は骨格筋のミトコンドリア生合成を増大させる (Hancock et al., 2008; Miller et al., 1984)。LCFA と同様に MCFA (炭素数 8~12 個) も骨格筋に取り込まれる分子であるが、骨格筋ミトコンドリアに対する MCFA の作用に関してはこれまで報告されておらず、MCFA による骨格筋ミトコンドリアの増加については明らかとなっていない。さらに、LCFA による骨格筋のミトコンドリアの増加は PPARs に対して LCFA がリガンドとして結合することによって生じるが(Xu et al., 1999)、MCFA が PPARs に対して結合するのかについても明らかとなっていない。そこで本研究では MCFA が LCFA と同様に骨格筋のミトコンドリアを増加させ、その機序に MCFA による PPARs に対する結合が関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために本研究では MCFA による骨格筋におけるミトコンドリアタンパク質の変化を検証して、PPARs に対する結合の有無を検証した。

本博士論文における実験の概要を以下に記すとともに、Figure III-1 にその構成を示した。

#### 1. MCFA 脂質食によるラット骨格筋ミトコンドリア関連酵素の増加 (実験 I)

4 週間にわたる LCFA 脂肪食摂取は骨格筋のミトコンドリアを増加させて、持久的運動時間を延長させる (Hancock et al., 2008; Miller et al., 1984)。MCFA 摂取は LCFA 摂取による体脂肪の蓄積を抑制させて (Bach and Babayan, 1982)、MCFA は骨格筋を含む各組織においてエネルギー

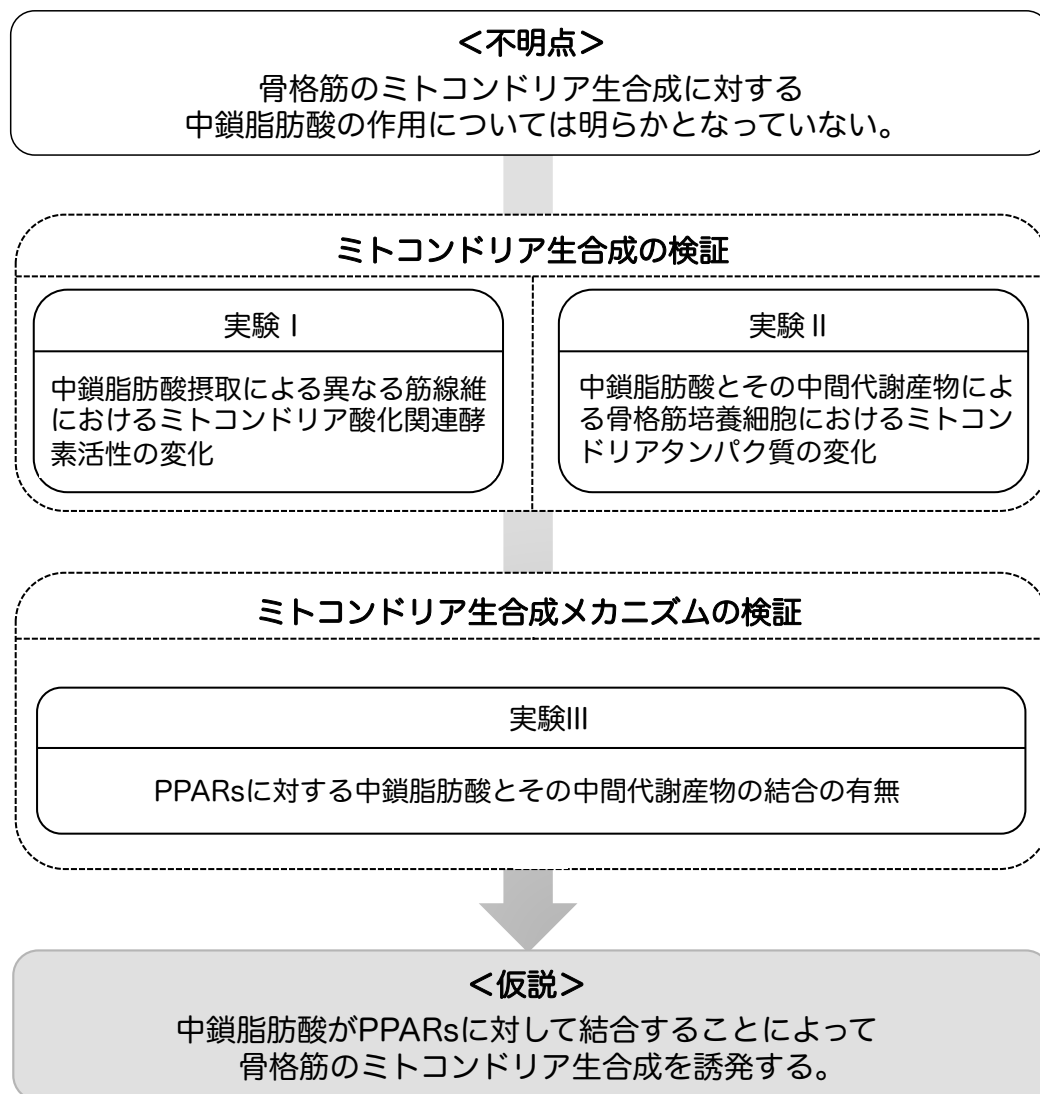


Figure III-1. The structure of the present study.  
This study is constructed of three sections. Experiment 1: Effects of MCFA ingestion on mitochondrial enzyme activity in rat skeletal muscles. Experiment 2: Effects of MCFA and its intermediate metabolite on mitochondrial protein in skeletal muscles cell. Experiment 3: The bind to PPARs by MCFA and its intermediate metabolite.

源として利用される。MCFA も LCFA と同様に骨格筋へ取り込まれる脂肪酸でありながら、これまで、骨格筋のミトコンドリア生合成に対する MCFA の作用についてはほとんど研究されてきておらず、MCFA が骨格筋のミトコンドリアを増加させるかについて明らかとなっていない。そこで本実験 I では、4 週間にわたる MCFA 脂質食を摂取したときのラット骨格筋の CS 活性および 3-HAD 活性の変化を検証した。

## 2. MCFA による骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質の変化 (実験 II)

実験 I では MCFA 脂質食摂取による骨格筋ミトコンドリアの変化を検証したものの、MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させる基質として作用しているのかについては不明である。そこで、実験 II では骨格筋培養細胞を用いて、3 種類の MCFA (オクタン酸 C6:0、デカン酸 C8:0 およびデカン酸 C10:0) のうちどの MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアを増加させる基質として作用しているのかについて検証した。さらに、MCFA は肝臓において一部ケトン体へ変換されて、その場合はケトン体が骨格筋のエネルギー源として利用される (Bach and Babayan, 1982)。そのため、MCFA だけでなく、ケトン体も骨格筋ミトコンドリアを増加させる基質である可能性が考えられるが、ケトン体による骨格筋ミトコンドリアの増加についてはこれまで報告されていない。以上のことから実験 II では、オクタン酸、デカン酸およびドデカン酸または  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (ケトン体) のうちどの基質が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させるのかについて検証した。

## 3. PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価 (実験 III)

実験Ⅰ、Ⅱでは MCFA とケトン体による骨格筋ミトコンドリアの増加を検証した。LCFA による骨格筋ミトコンドリアの増加は、LCFA が核内受容体 PPARs に対して結合することによって引き起こされる (Hancock et al., 2008; Xu et al., 1999)。各脂肪酸のうち、LCFA や不飽和度の異なる LCFA による PPARs の結合に関する違いについてはこれまで明らかとなっている (Xu et al., 1999)。しかしながら、脂肪酸の鎖長の違い、つまり MCFA が PPARs に対して結合するのかについてはほとんど報告されていない。また、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (ケトン体) は SCFA と非常に似た構造を持つが、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸による PPARs に対する結合に関しても報告されていない。本実験Ⅲでは、MCFA やケトン体は LCFA と同様に PPARs に対して結合することによって骨格筋のミトコンドリアを増加させるという仮説を検証するために、実験Ⅲでは PPARs に対する MCFA および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の結合の有無について検証した。

#### IV. MCFA 脂質食によるラット骨格筋ミトコンドリア関連酵素の増加 (実験 I)

##### 1. 目的

持久性トレーニングによる骨格筋の重要な適応は、ミトコンドリアの増加である (Holloszy et al., 1976)。さらに、LCFA 摂取によっても普通食と比較してミトコンドリア量および脂肪酸酸化が亢進する (Miller et al., 1983)。Turner et al. (2009) によって、MCFA 脂質食は普通食と比較して type IIa 線維の腓腹筋においてミトコンドリア関連酵素活性を増加させることが報告されている。しかしながら、彼らの研究に用いられていた MCFA 食は LCFA を約 50%含む LCFA と MCFA の混合食であったことから、MCFA 食によるミトコンドリアの増加は MCFA による効果であるとは示唆し難い。さらに、MCFA 脂質食は type IIa 線維以外の骨格筋に対してもミトコンドリア関連酵素活性を増加させるのかについて不明である。また、LCFA はミトコンドリアだけではなく、脂肪酸酸化の規定因子の一つである H-FABP を増加させることも分かっている (Chang et al., 2001)。しかしながら、MCFA によって H-FABP が増加するのかについては明らかとなっていない。そこで、本実験では MCFA を約 90% 含む MCFA 食を用いて、ヒラメ筋、上腕三頭筋および腓腹筋深層部・表層部におけるミトコンドリア関連酵素活性および H-FABP 含量の変化を検証した。

##### 2. 方法

本実験は奈良教育大学動物実験規約に則って計画され、倫理委員会の承認を得た。

#### A. 被験動物及び飼育環境

被験動物には 5 週齢 (body weight; 70 ~ 90 g) の Wistar 系雄性ラット (日本エルエスシー, Japan) を 19 匹用いて、これを普通食群 (Standard chow; SC 群: n = 6)、LCFA トリアシルグリセロール高脂肪食群 (LCFA 群: n = 6)、MCFA トリアシルグリセロール高脂肪食群 (MCFA 群: n = 7) に分けた。被験動物を室温  $22 \pm 1$  °C、湿度  $55 \pm 5\%$ 、そして 12 時間の明暗周期の環境下において実験当日まで飼育した。飼育期間中、餌と水はともに自由摂食とした。

#### B. 飼料

SC 群のそれぞれのカロリー比は炭水化物 64.5%、タンパク質 23.5%、脂質 11.9%とした。高脂肪食群のそれぞれのカロリー比は炭水化物 20% (25 g/kg corn starch, 180 g/kg sucrose, 56 g/kg cellulose)、タンパク質 20% (325 g/kg casein)、脂質 60% (LCFA 群: 360 g/kg LCFAs oil, MCFA 群: 324 g/kg MCFAs oil, 36 g/kg LCFAs oil) とした。それぞれの食餌を 4 週間にわたり摂餌させた。LCFA 群と MCFA 群の脂肪酸組成は Table IV-1 に示した。また、4 週間にわたる飼育期間中の飼料および水は自由摂取とした。

#### C. 実験手順

ラットにペントバルビタール (64.8 mg/kg; ソムノペンチル, Kyoritsu Seiyaku Corporation, Japan) による腹腔内注射によって麻酔を施し、ヒラメ筋 (0% fast-twitch glycolytic (FG), 19% FOG (fast-twitch oxidative glycolytic) and 89% SO (slow-twitch oxidative fibers) fiber (Armstrong and Phelps, 1984))、上腕三頭筋 (63% FG, 22% FOG and 15% SO fibers (Collatos

Table IV-1. Fatty acid composition of two lipids.

Fatty acid <sup>*</sup>	Percentage	
	MCFAs-diet	LCFAs-diet
C6:0	0.9	-
C8:0	74.3	-
C10:0	14.7	-
C12:0	0.2	-
C14:0	-	-
C16:0	0.5	5.4
C18:0	0.2	2.1
C18:1	3.5	35.3
C18:2	4.8	48.2
C18:3	0.8	8.3
C20:0	0.1	0.5

<sup>\*</sup>Two numbers following “C” denote the number of carbon atoms and the number of double bounds in fatty acid. LCFAs, long-chain fatty acids; MCFAs, medium-chain fatty acids.

et al., 1977) および腓腹筋深層部 (gasD; deep portion of gastrocnemius, 56% FG fibers, 38% FOG fibers and 4% SO fibers (Ariano et al., 1973) ) ・表層部 (gasS; surface portion of gastrocnemius, 58% FG, 37% FOG and 5% SO fibers (Ariano et al., 1973) ) および副睾丸脂肪組織を摘出した。摘出した筋は直ちに液体窒素で凍結し、測定に用いるまで-80℃で冷凍保存した。採血は腹部大動脈より行い、採血後 4℃で遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) して得た血清を血液性状の測定に用いた。

#### a. 脂肪組織重量

5 週間の飼育期間終了後、ペントバルビタール麻酔下で摘出した左右の副睾丸脂肪細胞組織を室温の Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (pH 7.4) で数回洗浄した後、濾紙で水分を拭き取り、重量を測定した。左右の平均値を脂肪組織重量として用いた。

#### b. 血中レプチン

血中レプチンの測定はレプチン測定用キット (Quantikine M: R&D system, USA) を用い、酵素免疫測定法 (ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) により測定した。50  $\mu$ l の Assay Diluent RD1W を 96 well プレート (MaxiSorp F96, Nunc, Roskilde, Denmark) の各 well に入れ、さらに 50  $\mu$ l の standard もしくは sample を各 well に入れ、2 時間室温でインキュベーションした。オートミニマイクロプレートウォッシャー (Auto Mini Washer AMW-8, Bio Tec, japan) を用い、Wash buffer で 5 回洗浄した後、100  $\mu$ l の mouse leptin conjugate を各 well に加え、再び 2 時間室温でインキュベーションした。再び Wash buffer で 5 回洗浄し、100  $\mu$ l の Substrate Solution を各 well に加え、30 分間室温の暗所でインキュベ



ーションした。100  $\mu$ l の Stop Solution を各 well に加え、30 分以内にマイクロプレートリーダー (imno leader NJ-2300, Bio-Rad, Richmond, USA) を用い、波長 450 nm において吸光度を測定した。

#### c. 血中アディポネクチン

アディポネクチンの測定はラットアディポネクチン測定用キット (6B76, Ootsuka, japan) を用い、ELISA によって測定した。350  $\mu$ l の Wash buffer を各 96 well プレート (MaxiSorp F96, Nunc, Roskilde, Denmark) に加え、マイクロプレートウォッシャー (Auto Mini Washer AMW-8: バイオテック製) で吸引除去した。100  $\mu$ l の standard もしくは sample を各 well に加え 60 分間室温でインキュベーションした後、マイクロプレートウォッシャーを用い、Wash buffer で 3 回洗浄した。100  $\mu$ l のビオチン標識抗体液を各 well に加え、60 分間室温でインキュベーションした後、再び Wash buffer で 3 回洗浄した。さらに 100  $\mu$ l の酵素標識ストレプトアビジン液を各 well に加え、60 分間室温でインキュベーションした後、再び Wash buffer で 3 回洗浄した。100  $\mu$ l の基質液を各 well に加え、15 分間室温でインキュベーションした後、100  $\mu$ l の反応停止液を各 well に加え、マイクロプレートリーダー (imno leader NJ-2300, Bio-Rad, Richmond, USA) を用い、波長 450 nm において吸光度を測定した。

#### d. CS 活性

ヒラメ筋、腓腹筋深層部と表層部、上腕三頭筋を 15 ~ 25 mg 切り取り、40 倍希釈となるように HES buffer (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose) を加え、氷冷しながらそれぞれの筋サンプルを均等化した。CS 活性の測定は Srere, (1969) の方法を用いた。凍結した均等液の解凍

-凍結-解凍を2回繰り返した後、100  $\mu$ l をマイクロセルにとった。これに、100 mM Tris HCl-buffer, pH8.0 を 0.6 ml, 3.0 mM Acetyl CoA 及び 1.0 mM DTNB をそれぞれ 0.1 ml 加え、数回の転倒混和後、30°Cに保った分光計 (Spectrophptpmeter U-1100, HITACHI, Japan) 内で5分間放置し、5分目より3分間、波長 412 nm で30秒毎に吸光度を測定した。その後、一旦マイクロセルを取り出し、5.0 mM Oxaloacetate を 0.1 ml 加えて、数回の転倒混和後、分光計内で1分間放置し、1分目より3分間、412 nm で30秒毎に吸光度を測定した。測定値を以下の計算式に当てはめることにより CS 活性値を求めた。CS 活性値は以下の式を用いて算出した。

$$\text{CS activity} = (\Delta' - \Delta) \times \text{volume} / E / \text{muscle weight}$$

$$\Delta' - \Delta = 1 \text{ 分間あたりの吸光度変化の差}$$

$$E = \text{モル吸光係数 (13.6 mM)}$$

$$\text{volume} = 1 \text{ ml}$$

$$\text{muscle weight} = \text{キュベット内の筋湿重量 (mg)}$$

#### e. 3-HAD 活性

3-HAD は Bass et al. (1969) の方法を用いて測定を行った。凍結した均等液の解凍-凍結-解凍を2回繰り返した後、100  $\mu$ l をマイクロセルにとった。これに Reaction mixture (167 mM triethalamine-HCl, pH7.0: 6.0 ml, 50 mM EDTA: 1.0 ml, 2.5 mM NADH: 1.0 ml) を 0.8 ml, 1 mM Acetoacetyl CoA を 0.1 ml 加え、数回の転倒混和後、30°Cに保った分光計 (Spectrophptpmeter U-1100, Hitachi, Japan) 内で5分間放置し、波長 340 nm で30秒毎に3分間、吸光度の変化を測定した。

$$\text{3-HAD activity} = (\Delta' - \Delta) \times \text{volume} / E / \text{muscle weight}$$

$$\Delta' - \Delta = 1 \text{ 分間あたりの吸光度変化の差}$$

$E$  = モル吸光係数 (6.22 mM)

volume = 1 ml

muscle weight = キュベット内の筋湿重量 (mg)

#### a. H-FABP 含量の測定

H-FABP 含量の測定は H-FABP ELISA test kit (Life Diagnostics, inc, USA) を用いた。サンプルは均等液上清を用いた。HES buffer で希釈したサンプルを 96 well プレート (MaxiSorp F96, Nunc, Roskilde, Denmark) にとり、Enzyme Conjugate Reagent を 100  $\mu$ l 加え室温で 60 分間振盪した。試薬を wash buffer で洗浄した後、well に 100  $\mu$ l の TMB 試薬を加えた後 10 秒間振盪して、室温および暗所で 20 分間インキュベートした。100  $\mu$ l の stop solution を加え、30 秒間振盪した後に、マイクロプレートリーダー (imno leader NJ-2300, Bio-Rad, Richmond, USA) を用いて 450 nm における H-FABP の吸光度を測定して、H-FABP の濃度を算出した。

#### b. 統計処理

統計量は平均値  $\pm$  SE で算出した。グループ間における比較には、繰り返しのない一元配置の分散分析を用いて、統計学的有意差を検討した。平均値に有意差が認められた場合には Tukey-Kramer の post-hoc test を行った。なお、有意水準は 5%未満とした。

### 3. 結果

#### A. 摂取カロリー

摂取カロリーは SC 群 ( $87 \pm 9$  cal/day と比較して LCFA 群 ( $109 \pm 8$  cal/day) において有意に高値を示し、さらに MCFA 群 ( $77 \pm 6$  cal/day)

と比較して LCFA 群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ; Table IV-2)。

#### B. 体重および副睪丸脂肪重量

Table IV-2 に体重および副睪丸脂肪重量を示した。体重は SC 群 ( $239 \pm 2$  g) と LCFA 群 ( $244 \pm 6$  g) と比較して、MCFA 群 ( $216 \pm 4$  g) において有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。副睪丸脂肪組織重量は LCFA 群 ( $2.7 \pm 0.2$  g) と比較して MCFA 群 ( $2.1 \pm 0.1$  g) および普通食群 ( $2.3 \pm 0.1$  g) で有意な低値を示した ( $p < 0.05$ )。

#### C. 血中レプチン、血中アディポネクチンおよび血糖

Table IV-2 に血中レプチンレベルおよび血中アディポネクチンを示した。血中レプチンレベルは SC 群 ( $0.7 \pm 0.1$  ng/ml) と比較して、LCFA 群 ( $2.3 \pm 0.4$  ng/ml) で約 3 倍の増加が見られた ( $p < 0.01$ )。MCFA 群 ( $1.4 \pm 0.4$  ng/ml) よりも LCFA 群の血中レプチンレベルは有意な増加を示した ( $p < 0.05$ )。血中アディポネクチンレベルは SC 群 ( $3.4 \pm 0.1$  ng/ml) および MCFA 群 ( $3.3 \pm 0.1$  ng/ml) と比較して、LCFA 群 ( $2.0 \pm 0.1$  ng/ml) において有意な低下を示したが ( $p < 0.05$ )、MCFA 群の血中アディポネクチンは SC 群とほぼ同じ値を示した。血糖値は SC 群 ( $202 \pm 9$  mg/dl) および MCFA 群 ( $220 \pm 25$  mg/dl) と比較して LCFA 群 ( $269 \pm 6$  mg/dl) において有意な増加を示した ( $p < 0.05$ )。

#### F. CS 活性

Figure IV-1 にヒラメ筋、腓腹筋および上腕三頭筋の CS 活性を示した。ヒラメ筋における CS 活性は SC 群 ( $34 \pm 1.6$   $\mu\text{mol/g wet tissue/min}$ ) と比較して MCFA 群 ( $44 \pm 1.1$   $\mu\text{mol/g wet tissue/min}$ ) において有意な増

Table IV-2. Body weight, energy intake, EFP weight, EFP weight/energy intake, plasma glucose, and adipocytokine concentrations in SC, MCFA and LCFA groups.

	SC	MCFA	LCFA
Body weight (g)	239 ± 2	216 ± 4 <sup>*</sup>	244 ± 6 <sup>#</sup>
Energy intake (kcal/day)	87 ± 9	77 ± 6	109 ± 8 <sup>*#</sup>
EFP weight (g)	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.7 ± 0.2 <sup>*#</sup>
EFP weight/Energy intake (g·day/kcal)	2.6 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Plasma glucose (mg/dl)	202 ± 9	220 ± 25	269 ± 6 <sup>*#</sup>
Plasma leptin (ng/dl)	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.4	2.3 ± 0.4 <sup>*#</sup>
Plasma adiponectin (ng/dl)	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1 <sup>*#</sup>

Data represent the mean ± SE (n = 5-7). <sup>\*</sup>: p < 0.05 vs. SC group; <sup>#</sup>: p < 0.05 vs. MCFA group. EFP, epididymal fat pad; LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; SC, standard chow.

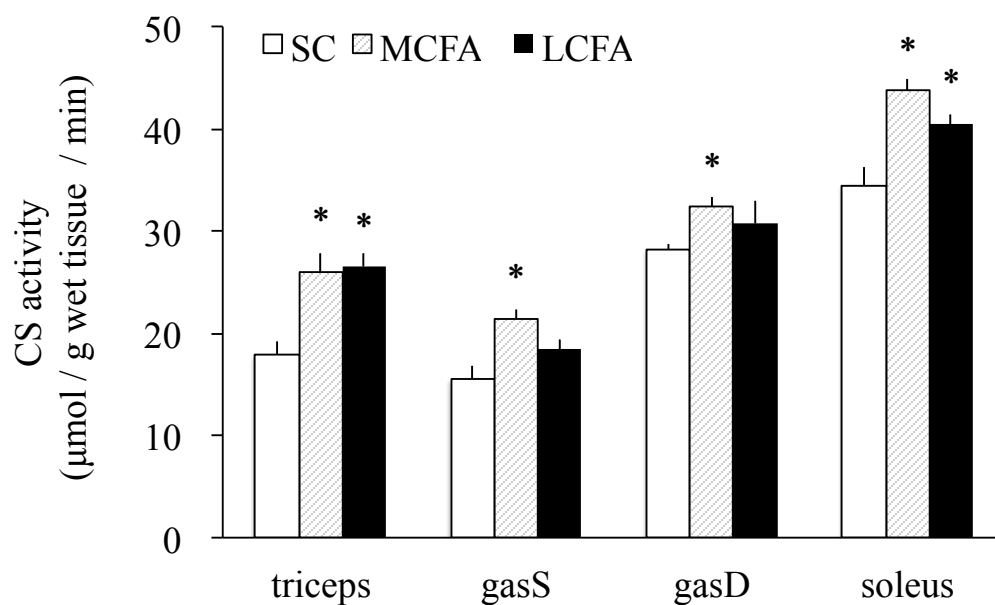


Figure IV-1. Citrate synthase (CS) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean  $\pm$  SE (n = 5-7). \*: p < 0.05 vs. SC group. gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; MCFA, medium-chain fatty acid; LCFA, long-chain fatty acid; SC, standard chow.

加を示し ( $p < 0.05$ )、SC 群と比較したときの MCFA 群の増加率は 31% であった。腓腹筋の表層部における CS 活性 は SC 群 ( $16 \pm 1.2 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して MCFA 群 ( $21 \pm 1.0 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示し、増加率は 26% であった ( $p < 0.05$ )。腓腹筋の深層部における CS 活性 は SC 群 ( $28 \pm 0.3 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して MCFA 群 ( $31 \pm 0.5 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示し、増加率は 10% であった ( $p < 0.05$ )。さらに上腕三頭筋における CS 活性 は SC 群 ( $18 \pm 0.6 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して MCFA 群 ( $26 \pm 1.3 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示し、増加率は 44% であった ( $p < 0.05$ )。また、さらに上腕三頭筋およびヒラメ筋における CS 活性 は SC 群と比較して LCFA 群で有意な増加を示し、それぞれの増加率は 45%、22% であった ( $p < 0.05$ )。

#### G. 骨格筋 3-HAD 活性

腓腹筋の深層部における 3-HAD 活性は SC 群 ( $28.2 \pm 1.1 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して、MCFA 群 ( $32.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ; Figure IV-2)。上腕三頭筋における 3-HAD 活性は SC 群 ( $7.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して、MCFA 群 ( $9.0 \pm 0.1 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ; Figure IV-2)。さらに、ヒラメ筋における 3-HAD 活性も SC 群 ( $21.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) と比較して、MCFA 群 ( $25.7 \pm 1.4 \mu\text{mol/ g wet tissue/ min}$ ) で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ; Figure IV-2)。

#### H. 骨格筋 H-FABP 含量

Figure IV-3 にヒラメ筋、腓腹筋および上腕三頭筋の H-FABP 含量を示

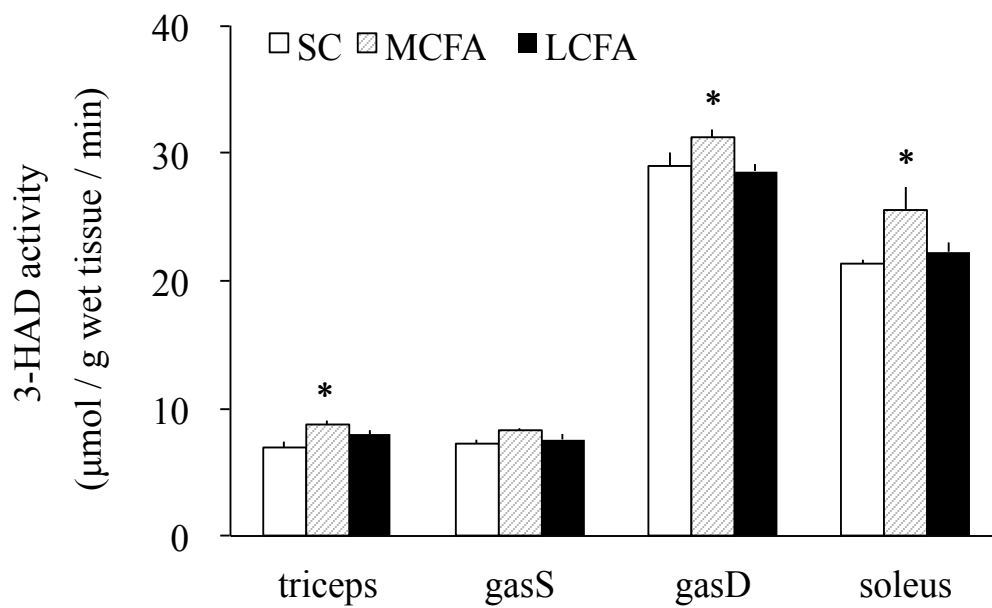


Figure IV-2. 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean  $\pm$  SE (n = 5-7). \*: p < 0.05 vs. SC group. gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; MCFA, medium-chain fatty acid; LCFA, long-chain fatty acid; SC, standard chow.



した。ヒラメ筋における FABP 含量は SC 群 ( $26.3 \pm 6.6 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) および MCFA 群 ( $28.0 \pm 7.5 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) と比較して、LCFA 群 ( $62.3 \pm 7.3 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) において有意な増加がみられた ( $p < 0.05$ )。同様に、腓腹筋の深層部における FABP 含量も SC 群 ( $22.3 \pm 6.6 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) および MCFA 群 ( $27.7 \pm 6.2 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) と比較して、LCFA 群 ( $59.7 \pm 21.8 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) で有意な増加がみられた ( $p < 0.001$ )。腓腹筋の表層部における FABP 含量は SC 群 ( $0.3 \pm 0.4 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) と比較して LCFA 群 ( $2.4 \pm 0.7 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) で有意な増加を示した ( $p < 0.01$ )。上腕三頭筋では SC 群 ( $3.3 \pm 1.1 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) および MCFA 群 ( $4.1 \pm 1.5 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) と比較して、LCFA 群 ( $6.2 \pm 1.4 \mu\text{g/g wet tissue}$ ) において有意な増加がみられた ( $p < 0.05$ )。

#### 4. 考察

本実験では MCFA 脂肪食を 4 週間にわたり摂取させ、ラット骨格筋におけるミトコンドリア関連酵素活性および H-FABP 含量の変化を検証した。その結果、骨格筋におけるミトコンドリア関連酵素活性は MCFA 脂肪食によって増加した一方で、H-FABP 含量は MCFA 脂肪食によって変化しなかった。これらの結果は、MCFA 脂肪食は細胞質における脂肪酸関連タンパク質ではなく骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発することを示唆している。

##### A. MCFA 脂質食による骨格筋ミトコンドリア系酵素活性の変化

本実験では、MCFA 脂質食は普通食と比較して速筋線維および遅筋線維においてミトコンドリア系酵素活性を亢進させることを示した。持久性トレーニングによる骨格筋の重要な適応はミトコンドリアの密度やミ

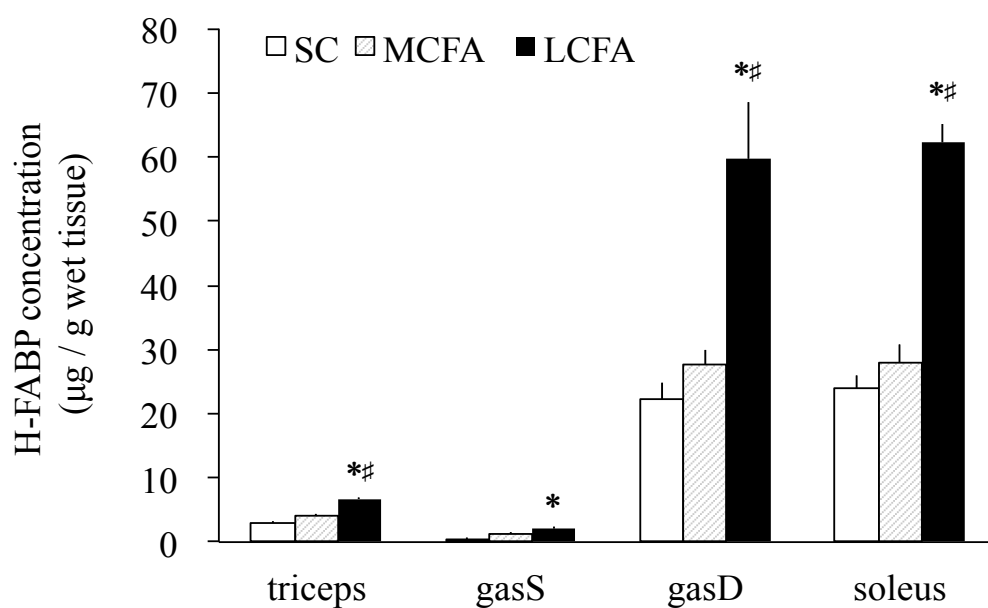


Figure IV-3. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) concentration in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean  $\pm$  SE (n = 5-7). \*: p < 0.05 vs. SC group, #: p < 0.05 vs. MCFA group. gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; MCFA, medium-chain fatty acid; LCFA, long-chain fatty acid; SC, standard chow.

トコンドリア酸化系酵素活性の亢進である (Holloszy et al., 1976)。さらに、LCFA 脂質食の摂取によって普通食と比較してミトコンドリア量および脂肪酸酸化が亢進することが分かっている (Miller et al., 1983)。

Turner et al. (2009) は MCFA 脂質食でも腓腹筋のミトコンドリアタンパク質を増加させることを報告している。しかしながら、この研究に用いられた MCFA 脂質食は LCFA を約 50%含む LCFA と MCFA の混合食であったことから (Turner et al., 2009)、MCFA によるミトコンドリアタンパク質の増加効果を検証するためには必須 LCFA 以外の LCFA の摂餌量を排除すべきである。そこで、本実験では MCFA を約 90%含んだ MCFA 脂質食を与えて、骨格筋のミトコンドリア系酵素を検出した。その結果、MCFA 脂質食によってヒラメ筋、上腕三頭筋、腓腹筋深層部および腓腹筋表層部における CS 活性が亢進した。さらに、腓腹筋表層部において MCFA 脂質食の CS 活性は LCFA 脂質食と比較して増加する傾向を示した。また、MCFA 脂質食における 3-HAD 活性は普通食と比較して有意に亢進した。これらの結果は、MCFA 脂質食によって遅筋線維および速筋線維双方においてミトコンドリア生合成を誘発することを示し、さらに MCFA 脂質食によって  $\beta$  酸化も亢進させているかもしれないことを示唆している。LCFA 脂質食摂取による骨格筋のミトコンドリアの増加は、LCFA 自身が核内受容体 PPARs や PGC-1 $\alpha$  に作用することが理由として考えられている (Hancock et al., 2008; Xu et al., 1999)。しかしながら、MCFA による骨格筋ミトコンドリア増加のメカニズムについてはこれまで明らかとなっていない。本実験 I の結果から、MCFA も LCFA と同様に転写因子に直接働きかけている可能性が推測されるが、その機序は不明である。以上のことから、MCFA 脂質食は速筋線維および遅筋線維においてミトコンドリア生合成を誘発させることを示唆する。

## B. MCFA 脂質食による骨格筋細胞質の脂肪酸関連タンパク質の変化

骨格筋における H-FABP の増加に対して、脂肪酸鎖長の異なる違いに関する研究はこれまで報告されていない。Zonderland et al. (1999) によって、LCFA 脂質食は肝臓および脂肪組織の FABP タンパク質レベルを上昇させることが報告されている。さらに Chang et al. (2001) によって、L6 細胞における H-FABP mRNA の発現が LCFA 刺激によって増加することが示された。しかしながら、MCFA が FABP に対して増加させるかについてこれまで報告されていない。先行研究と一致して、本実験でも LCFA 脂質食は速筋線維および遅筋線維の双方において H-FABP 含量を増加させた。しかしながら、MCFA 脂質食によって H-FABP 含量は変化しなかった。脂肪酸の鎖長の違いによって、細胞質に局在する脂肪酸関連タンパク質の増加に違いが生じた理由として、その発現に関わる転写因子に対して脂肪酸の鎖長によってその作用が異なる可能性が考えられる。しかしながら、MCFA および LCFA によるタンパク質制御経路の違いに関しては明らかとなっていない。これらの結果から、細胞質に局在する脂肪酸関連タンパク質の増減は脂肪酸鎖長の違いによって異なることを示している。

## C. MCFA 脂質食による体脂肪蓄積の抑制

本実験においても先行研究と一致して (Bach et al., 1996)、MCFA 脂質食は内臓脂肪の蓄積を引き起こさないことを示した。LCFA 脂質食と MCFA 脂質食間のエネルギー摂取量と EFP 比に差がみられなかったことから、MCFA 脂質食による脂肪蓄積の抑制は総エネルギー摂取量の減少によるものと考えられる。さらに、血糖値の上昇も MCFA 脂質食においてみられず、血中アディポネクチンおよびレプチンの分泌異常も誘発さ

れなかった。これらの結果は、MCFA 脂質食による体脂肪の増加抑制によって、血中アディポネクチンおよびレプチンレベルの正常を維持することを可能とすることを示唆している。さらに MCFA は LCFA 脂質食によって生じる糖代謝異常発症の危険性を減弱させる可能性を有していることが推測される。

## 5. 要約

実験 I では MCFA 脂質食による骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性および細胞質における脂肪酸関連タンパク質の増加の有無を検証した。その結果、MCFA 脂質食は体脂肪の蓄積を引き起こさずに、細胞質の脂肪酸結合関連タンパク質ではなく、骨格筋ミトコンドリア生合成を誘発することを示唆した。

## V. MCFA による骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質の変化 (実験 II)

### 1. 目的

実験 I では普通食と比較して MCFA 脂質食摂取において骨格筋のミトコンドリアを増加させたことを示した。しかしながら、MCFA そのものが骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させる基質として作用しているのかについては不明である。そこで、実験 II では骨格筋培養細胞を用いて、3 種類の MCFA (オクタン酸 C6:0、デカン酸 C8:0 およびドデカン酸 C10:0) のうちどの MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアを増加させる基質として作用しているのかについて検証した。さらに、MCFA は肝臓において一部ケトン体へ変換されてケトン体が骨格筋のエネルギー源として利用される (Bach and Babayan, 1982)。そのため、MCFA だけでなくケトン体も骨格筋ミトコンドリアを増加させる基質である可能性が考えられるが、ケトン体による骨格筋ミトコンドリアの増加についてはこれまで報告されていない。そこで実験 II では、オクタン酸、デカン酸およびドデカン酸または  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (ケトン体) のうちどの基質が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させるのかについて検証した。

### 2. 方法

#### A. 培養細胞および培養方法

本実験にはマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞 (ATCC, Japan) を使用した。C2C12 細胞を 5% CO<sub>2</sub>、37°C に維持された CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> incubator SCA-165DRS, Astec, Japan) 内で培養した。全ての作業は細胞培

養安全キャビネット LAL-1300XA2 (Oriental Laboratory Design, Japan) 内で行った。

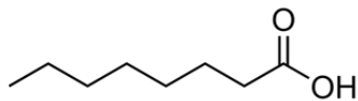
C2C12 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS; fetal bovine serum, Wako, Japan) と 1%ペニシリンストレプトマイシン (PS; penicillin streptomycin, Wako, Japan) を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Dulbecco's modified eagle medium) で培養した (Med I)。10 cm ディッシュに播種した細胞が 80-90%コンフルエントになった時点で、Med I を 2%ウシ成牛血清 (DBS; donor bovine serum, Wako, Japan) と 1%PS を添加した DMEM (Med II) に交換し、分化誘導を行った。分化誘導 5 日後、培地を Med II にオクタン酸、デカン酸、ドデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加した添加培地に替え、添加を行った。

#### B. 添加試薬および添加方法

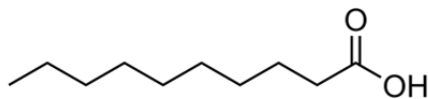
添加試薬には 50, 100, 250, 500, 1000  $\mu$ M オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (Figure V-1) を使用し、24 時間の添加を行った。試薬は DMEM に溶解した後、滅菌フィルター (GE Life Science Japan, Japan) を用いて濾過滅菌し、Med II に添加することによって細胞培地を調整した。

安全キャビネット内で Med II をアスピレーター (As One, Japan) で吸引し、D-PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline Tween-20, Wako, Japan) で洗浄後、再度アスピレーターで D-PBS を吸引した。Med II を除去した後、各添加試薬を含んだ Med III に交換した。コントロール条件は同様に D-PBS で洗浄後、添加因子を含まない Med III (Med II) に交換した。37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で 24 時間の添加を行った。添加実

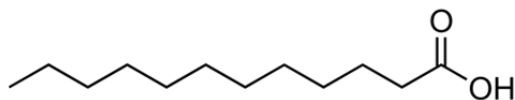
A. octanoic acid ( $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ )



B. decanoic acid ( $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ )



C. dodecanoic acid ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2$ )



D.  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$ )

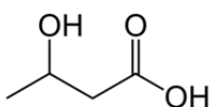


Figure V-1. Structure of octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate.



験終了後、細胞を D-PBS で 3 回洗浄し Med III を除去し、ディッシュのまま -80°C で凍結させた。

#### C. サンプル調製法

サンプル調製は以下の方法で実施した。

氷上において、凍結したディッシュに 700  $\mu$ l の homogenize buffer (150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.1% pepstatine, 10  $\mu$ M Leupeptine, 50  $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor, 2 mM DTT, 100  $\mu$ M benzamidine, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) を加え、細胞をセルスクレーパーを用いて回収した。回収した細胞はペッスルを使用してホモジネートを行った後、更に 27 G の注射針のシリンジに細胞を 20 回通して粉碎処理を行った。得られたサンプルは遠心分離装置 (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany) にて遠心分離 (700g, 10 min, 4°C) を行った。そこで得られた上澄みをサンプルとして使用した。

#### D. ウェスタンブロッティング

サンプルは 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) によって分子量ごとに分離された。泳動は 20 mA/ゲル、室温 (22-24°C) 下で行った。

泳動終了後、トランスファー装置 (Criterion, Bio Rad, USA) を用いてタンク式ブロッティングを行った。陽極側からトランスファー溶液 (56 mM Tris, 39 mM Glycine, 0.0376% SDS, 15% methanol) に浸したパット、ろ紙 (filter paper, ATTO, Japan) を 1 枚、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜; polyvinylidene difluoride membranes, ATTO, Japan)、泳動後のゲル、ト

ランスファーバッファーに浸したろ紙1枚、パットを順に重ねて、ブロッキングを開始した。なお、メンブレンは約30秒間メタノール(Wako, Japan)で湿潤させた後、トランスファー溶液に30分以上浸潤させた。転写条件は100Vの定電圧、60分間の転写時間とした。メンブレンの洗浄にはTBS-T (0.1% Tween-20, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4)を使用した。転写後のメンブレンを10分間TBS-Tで振盪させ、4% ブロックエースを用いてブロッキングを行った。ブロッキングは室温で60分間行った。一次抗体はCan Get Signal (東洋紡ライフサイエンス, Japan)のSolution1を用いて2500倍に希釈、またはブロッキング溶液を用いて1000倍に希釈し、4°Cで一晩振盪させながらインキュベートした。VDAC (voltage dependent anion channel)の一次抗体にはRabbit polyclonal antibody to VDAC1/Porin (ab15895, Abcam, USA)を、COX-IV (cytochrome c oxidase-IV)の一次抗体にはMouse monoclonal antibody to COX-IV (ab14744, Abcam, USA)を、UCP3 (uncoupling protein3)の一次抗体にはRabbit polyclonal antibody to UCP3 (ab3477, Abcom, USA)を、 $\alpha$ -actininの一次抗体にはRabbit polyclonal antibody to  $\alpha$ -actini (3134S, CST, USA)それぞれ用いた。2次抗体はAnti-rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (Peroxidase-Linked Secondary Antibodies, GE healthcare, England)またはAnti-mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (Peroxidase-Linked Secondary Antibodies, GE healthcare, England)をCan Get Signal (東洋紡ライフサイエンス, Japan)のSolution2またはTBS-Tを用いて2500倍に希釈し、室温で1時間振盪させながらインキュベートした。検出にはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase)を基質として反応させるECL (Enzymatic Chemiluminescence)法を用いた。

#### E. メンブレンの画像解析と定量

蛍光発光は化学発光イメージシステム MicroChem (Berthold Technologies, USA) を用いてグレースケールデータとして画像を取り込んだ。取り込んだデジタル画像は、Image J (ver. 1.43, NIH, USA) を用いて定量分析した。グレースケール画像はソフトが有する濃度階調特性 (最大 16 bit) 中にある濃度で画素を形成する。定量数値として用いた値は選択した範囲におけるグレー値の濃度の合計であった。本研究において検出したバンドは、選択した範囲のグレー値と同じ面積のバックグラウンドを差し引いた値とした。各サンプルのタンパク質検出量の単位は Arbitrary Unit (AU) に設定した。

#### F. 統計処理

全ての統計量は平均値  $\pm$  SD で表した。異なる添加条件間におけるタンパク質量の比較には、繰り返しのない一元配置の分散分析を行い、平均値に有意差が認められた場合には Tukey-Kramer の post-hoc test を行った。なお、有意水準は 5%未満とした。

### 3. 結果

#### A. オクタン酸によるミトコンドリア関連タンパク質の変化

Figure V-2、4 にはオクタン酸およびドデカン酸による UCP3、COX-IV および VDAC タンパク質量を示した。すべての添加条件において、UCP3、COX-IV および VDAC タンパク質量は変化しなかった。

Figure V-3 にはデカン酸による UCP3、COX-IV および VDAC タンパク質量を示した。100、250 および 500  $\mu$ M デカン酸添加において、COX-IV タンパク質量がコントロールと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

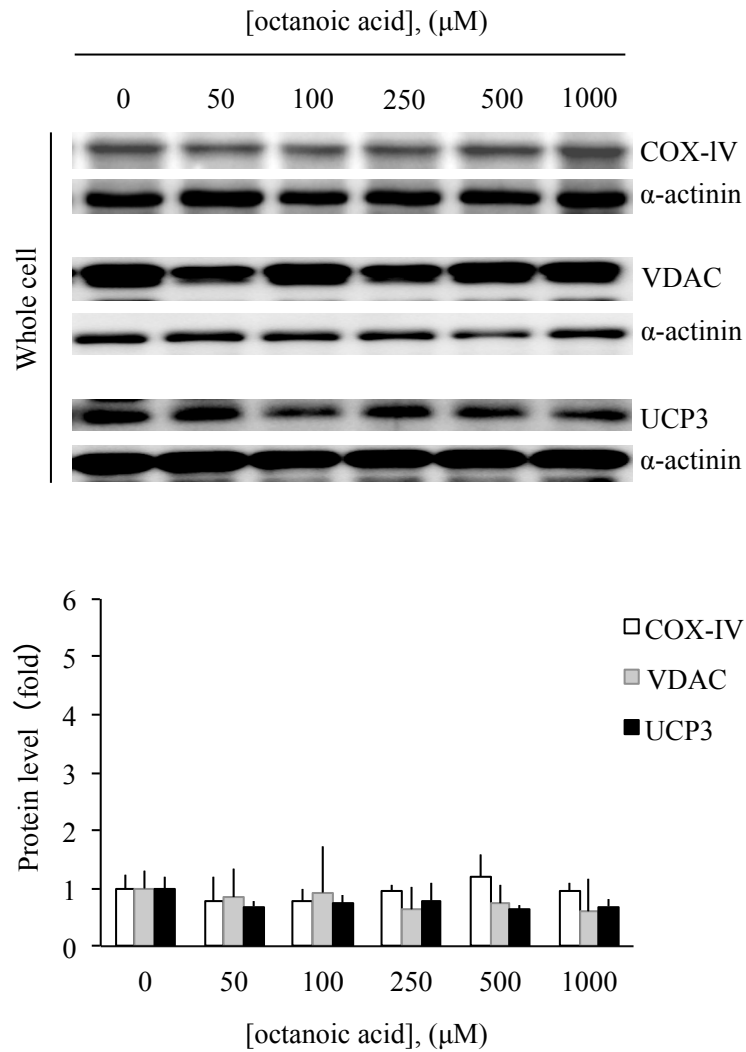


Figure V-2. COX-IV, VDAC and UCP3 proteins of C2C12 cell treated with octanoic acid. Data represent mean  $\pm$  SD (n = 6). COX-IV, cytochrome c oxidase-IV; UCP3, uncoupling protein; VDAC, voltage-dependent anion channels.

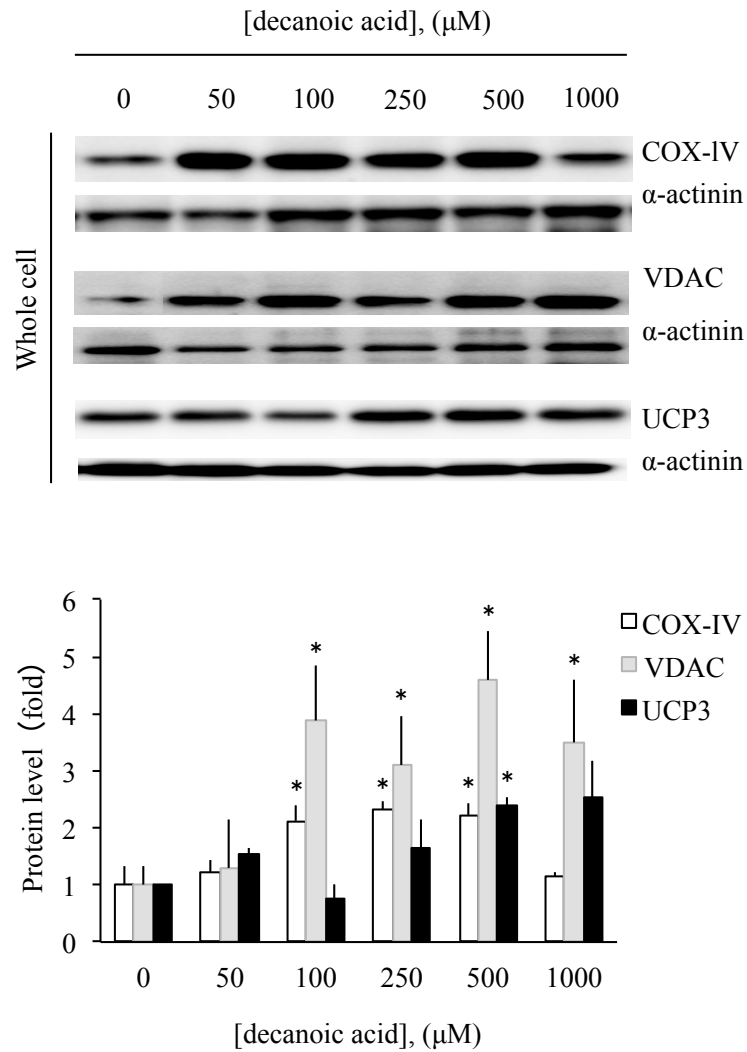


Figure V-3. COX-IV, VDAC and UCP3 proteins of C2C12 cell treated with decanoic acid. Data represent mean  $\pm$  SD (n = 6). \*:  $p < 0.05$  vs. 0  $\mu$ M. COX-IV, cytochrome c oxidase-IV; UCP3, uncoupling protein; VDAC, voltage-dependent anion channels.

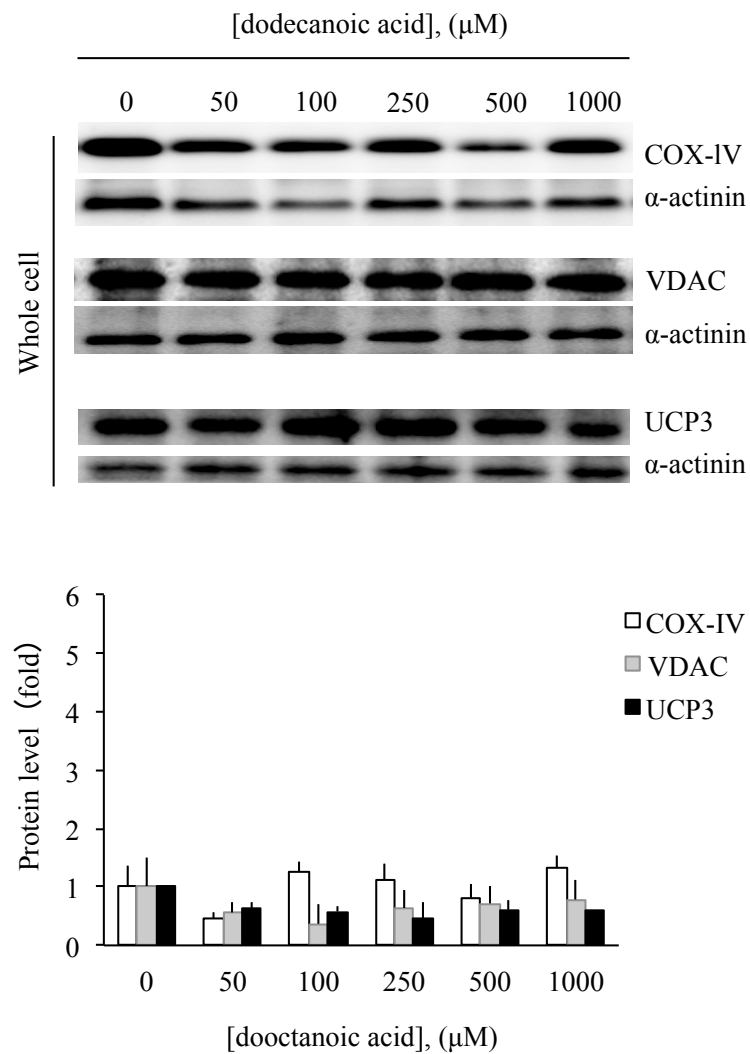


Figure V-4. COX-IV, VDAC and UCP3 proteins of C2C12 cell treated with dodecanoic acid. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). COX-IV, cytochrome c oxidase-IV; UCP3, uncoupling protein; VDAC, voltage-dependent anion channels.

100、250、500 および 1000  $\mu\text{M}$  デカン酸添加において、VDAC タンパク質量がコントロールと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。さらに 500  $\mu\text{M}$  デカン酸添加において、UCP3 タンパク質量がコントロールと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。1000  $\mu\text{M}$  デカン酸添加において、UCP3 タンパク質量がコントロールと比較して高い傾向を示した ( $p = 0.09$ )。Figure V-5 には  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸による UCP3、COX-IV および VDAC タンパク質含量を示した。250、500  $\mu\text{M}$   $\beta$ -ヒドロキシ酪酸添加において、COX-IV タンパク質含量がコントロールと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。さらに 250、500 および 1000  $\mu\text{M}$   $\beta$ -ヒドロキシ酪酸添加において、VDAC タンパク質含量がコントロールと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

#### 4. 考察

実験 II では、3 種類の MCFA と、MCFA の中間代謝産物であるケトン体のうちどの基質が骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質を増加させるのかについて検証した。その結果、デカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋細胞の COX-IV、VDAC タンパク質含量を増加させた。これらの結果はデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発することを示唆している。

##### A. MCFA による骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質の増加

本実験では、3 種類の MCFA のうち炭素数 10 個のデカン酸のみが骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質を増加させる基質であることを示した。MCFA における骨格筋培養細胞のミトコンドリアに対する作用はこれまでほとんど報告されていない。骨格筋において LCFA 飽和脂

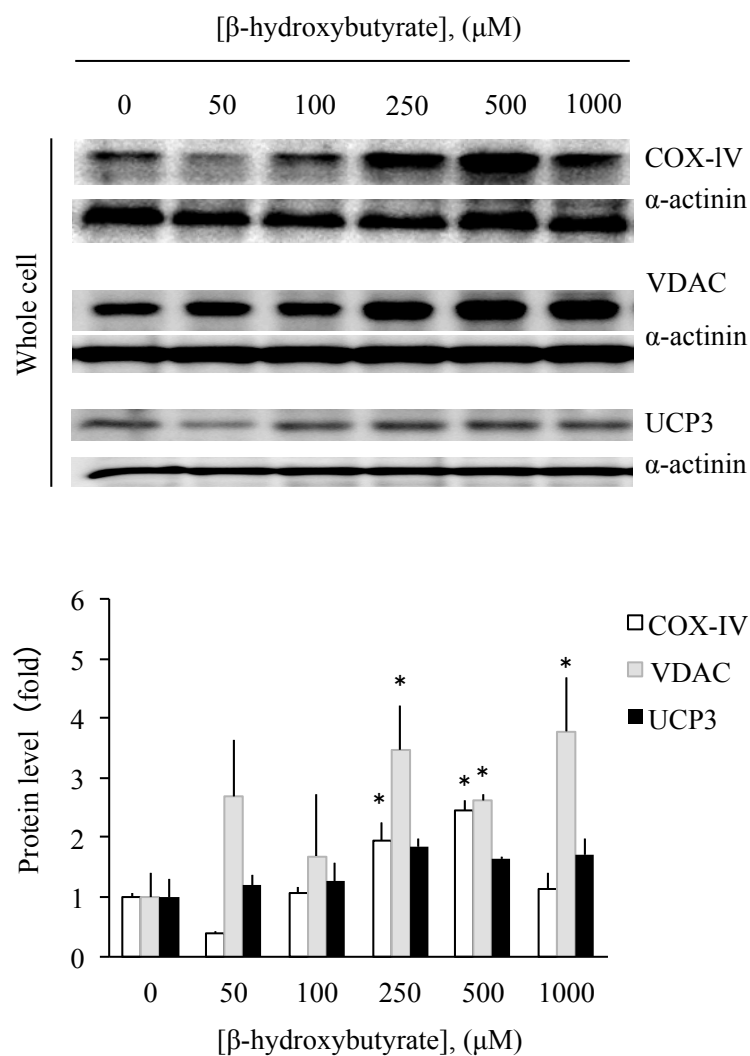


Figure V-5. COX-IV, VDAC and UCP3 proteins of C2C12 cell treated with  $\beta$ -hydroxybutyrate. Data represent mean  $\pm$  SD (n = 6). \*:  $p < 0.05$  vs. 0  $\mu$ M. COX-IV, cytochrome c oxidase-IV; UCP3, uncoupling protein; VDAC, voltage-dependent anion channels.



脂肪酸や LCFA 不飽和脂肪酸は PGC-1 $\alpha$  タンパク質および mRNA を増加させてミトコンドリア関連タンパク質を増加させる (Zang et al., 2005)。安静時、骨格筋組織において脂肪酸は 100 ~ 150  $\mu$ M 程度含まれている (Baranowski et al., 1998)。本実験において 100  $\mu$ M 以上のデカン酸において筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質が増加したことから、生体内においてもデカン酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる基質として作用しているかもしれない。したがって、MCFA 脂質食によるミトコンドリア生合成はデカン酸によって誘発されているかもしれないことが推測される。しかしながら、生体内においてデカン酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を促すのかについては不明であるため、今後、組織レベルにおいてデカン酸が骨格筋のミトコンドリア関連タンパク質を増加させるのかについて確認する必要がある。以上のことから、デカン酸は骨格筋細胞のミトコンドリア生合成を誘発する基質であることを示唆する。

B. ケトン体による骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質の増加

MCFA の摂取後、一部の MCFA はその構造を維持したまま骨格筋へ取り込まれる。しかしながら、大部分が肝臓においてケトン体へ変換されて、ケトン体が骨格筋のエネルギー源として取り込まれる (Bach and Babayan, 1982)。これまで、ケトン体による骨格筋のミトコンドリアに対する作用については報告されていない。本実験ではケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させて、ミトコンドリア生合成を誘発する基質であることを示唆した。肝臓におけるケトン体への変換や組織への取り込みは、絶食や運動等といったエネルギー不足の状況下において高まる (Midaoui et al., 2006)。さらに、

Xu et al. (2010) によって MCFA 脂質食を摂取するとケトン体の産生が高まり、ケトン体が各組織へエネルギー源として取り込まれることが報告されている。これらのことから、実験 I による MCFA 脂質食によるミトコンドリア生合成はデカン酸と共に、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によって誘発されている可能性が考えられる。しかしながら、デカン酸と同様に今後、組織レベルにおいて MCFA 脂質食を摂取した際に、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリア関連タンパク質を増加させているのかについて確認する必要がある。以上のことから、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は骨格筋細胞のミトコンドリア増殖を誘発する基質であることを示唆する。

## 5. 要約

本実験では 3 種類の MCFA のうちデカン酸およびケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋細胞においてミトコンドリア生合成を誘発する基質であることを示唆した。これらの結果から、実験 I で示唆された MCFA 脂質食摂取による骨格筋ミトコンドリア生合成に対してデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が作用している可能性が推測された。

## VI. PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価（実験Ⅲ）

### 1. 目的

実験Ⅰ、Ⅱによって MCFA のうちデカン酸とケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリアタンパク質を増加させることを示唆した。LCFA によるミトコンドリアの増加 (Hancock et al., 2008; Miller et al., 1983) は、LCFA が核内受容体 PPARs に対して結合することによって誘発される (Xu et al., 1999)。一方、MCFA やケトン体による転写関連因子に対する作用はこれまでほとんど報告されておらず、MCFA やケトン体による PPAR に対する結合の有無に関して明らかとなっていない。そこで、実験Ⅲでは PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合について検証した。さらに、骨格筋細胞における MCFA による PPARs タンパク質の変化について検証した。

### 2. 方法

#### A. 試薬

GW7674 およびオクタン酸は Sigma (Taufkirchen, Germany)、GW501516 は Enzo (Enzo life science, Farmingdale, NY)、ステアリン酸、ミリスチン酸およびデカン酸、ドデカン酸は Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) から購入した。さらに  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸、 $\gamma$ -リノレン酸およびパルミチン酸は Cayman chemical (Ann Arbor, MI) から購入した。

#### B. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) assays

PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  に対する各基質の結合評価として、LanthaScreen TR-FRET Coactivator Assays (Invitrogen) を用いて検証した。このアッセイはテルビウム標識 GST 抗体を介して GST タグ付テルビウムキレート受容体を標識し、コアクチベータータンパク質由来蛍光標識ペプチドを用い

ることによって、受容体とペプチドとのリガンド依存性結合を時間分解蛍光共鳴エネルギー転移 (TR-FRET) によって測定した (Figure VI-1)。

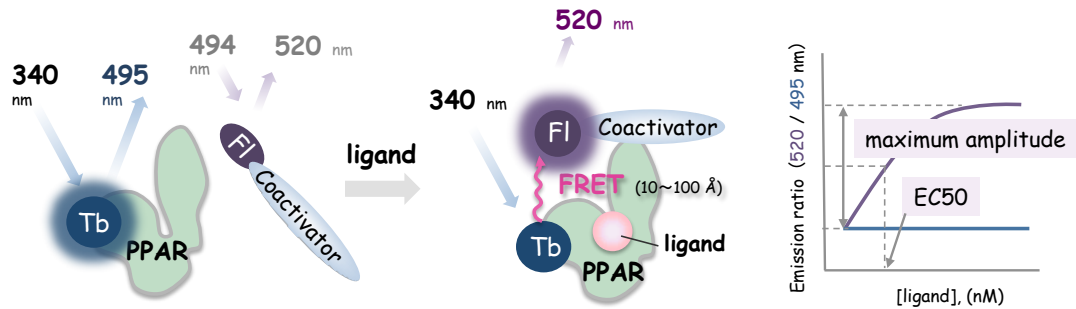
TR-FRET コレギュレーターバッファー G に、1 M DTT を最終濃度 5 mM DTT となるように加えて、希釈 TR-FRET コレギュレーターバッファー G を調製した。希釈 TR-FRET コレギュレーターバッファー G に、DMSO を最終濃度 2% DMSO となるように加え、この溶液 10  $\mu$ l を 384 プレートに分注した。その後、terbium-labeled anti-GST タグ付き glutathione S-transferase (GST) -tagged PPAR $\alpha$  もしくは PPAR $\delta$  LBD を加えた。さらに fluorescein-labeled coactivator peptide-PGC1 $\alpha$  および fluorescein-labeled coactivator peptide-C33 を加え、1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートリーダー (Infinite 200 PRO, Tecan, USA) を用いてドナー側の励起波長 340 nm、発光波長 495 nm およびアクセプター側の励起波長 340 nm、発光波長 520 nm の二波長同時蛍光測定を行った。Figure VI-1 に測定原理を、Table VI-1 に測定条件を記した。

### C. 培養細胞および培養方法

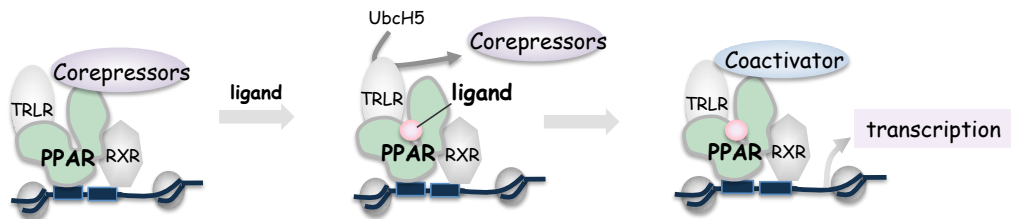
本実験にはマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞 (ATCC, Japan) を使用した。C2C12 細胞を 5%CO<sub>2</sub>、37°C に維持された CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> incubator SCA-165DRS, Astec, Japan) 内で培養した。全ての作業は細胞培養安全キャビネット LAL-1300XA2 (Oriental Laboratory Design, Japan) 内で行った。

C2C12 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS; fetal bovine serum, Wako, Japan) と 1%ペニシリンストレプトマイシン (PS; penicillin streptomycin, Wako, Japan) を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Dulbecco's modified eagle medium) で培養した (Med I)。10 cm ディッシュに播種した細胞が 80-90%コンフルエントになった時点で、Med I を 2%ウシ成牛血清 (DBS; donor bovine serum, Wako, Japn) と 1%PS を添加した DMEM (Med II) に

### A. Lantha Screen PPARs TR-FRET assay



### B. The mechanism for transcriptional regulation of PPARs by ligand



(modified from Yang et al., 2014; Xu et al., 1999)

Figure VI-1. The principle of Lantha screen PPARs coactivator TR-FRET assay. A. When the terbium label on the anti-GST antibody is excited at 340 nm, energy is transferred to the fluorescein label on the coactivator peptide and detected as emission at 520 nm. B. The mechanism for transcriptional regulation of PPARs by ligand (modified from Yang et al., 2014; Xu et al., 1999). EC50, half maximal effective concentration; Fl, fluorescein; Tb, terbium; TR-FRET, time-resolved fluorescence resonance energy transfer; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid X receptor; TRLR, Toll-like receptor; UbcH5, Ubiquitin-conjugating enzyme E2.

Table VI-1. The measurement condition of Lanthanide screen PPARs coactivator TR-FRET assay in TECAN microplate reader.

Measurement parameter	Donor Emission	Acceptor Emission
Mode	Fluorescence top reading	Fluorescence top reading
Excitation Wavelength	340 nm	340 nm
Excitation Bandwidth	35 nm	35 nm
Emission Wavelength	494 nm	520 nm
Emission Bandwidth	10 nm	10 nm
Gain	optimal	optimal
Number of flashes	25	25
Integration Time	200 $\mu$ s	200 $\mu$ s
Lag Time	100 $\mu$ s	100 $\mu$ s
Settle Time	0 ms	0 ms

PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TR-FRET, time-resolved fluorescence resonance energy transfer.

交換し、分化誘導を行った。分化誘導 5 日後、培地を Med II にオクタン酸（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）を添加した添加培地に替え、添加を行った。

#### D. 添加試薬および添加方法

添加試薬には 50、100、250、500、1000  $\mu$ M オクタン酸を使用し、24 時間の添加を行った。試薬は DMEM に溶解した後、滅菌フィルター（GE Life Science Japan, Japan）を用いて濾過滅菌し、Med II に添加することによって細胞培地を調整した。

安全キャビネット内で Med II をアスピレーター（As One, Japan）で吸引し、D-PBS（Dulbecco's phosphate buffer saline Tween-20, Wako, Japan）で洗浄後、再度アスピレーターで D-PBS を吸引した。Med II を除去した後、各添加試薬を含んだ Med III に交換した。コントロール条件は同様に D-PBS で洗浄後、添加因子を含まない Med III (Med II) に交換した。37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で 24 時間の添加を行った。添加実験終了後、細胞を D-PBS で 3 回洗浄し Med III を除去し、ディッシュのまま -80°C で凍結させた。

#### E. サンプル調製法

サンプル調製は以下の方法で実施した。氷上において、凍結したディッシュに 700  $\mu$ l の D-PBS を加え、細胞をセルスクレーパーを用いて回収し、液体窒素で凍らせて、-80°C で保存した。低張液バッファー（10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT）で解凍した細胞量の 5 倍量で再懸濁し、15 分間放置して細胞を膨張させる。サンプルは遠心分離装置（Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany）にて遠心分離（700g, 15 min, 4°C）を行った。その後、ペッスルを使用してホモジネートを行い、細胞を破砕

して、再び遠心分離（2000g, 5 min, 4°C）を行った。さらにペレットを新しいバッファーで再懸濁した後、遠心分離（15000g, 20 min, 4°C）を行った。上澄みを除き、沈殿した核画分に高張液バッファー（20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT）を加え、27 G の注射針のシリンジに細胞を 20 回通して核画分をホモジナイズした。粗核抽出液を 30 分間、ローテーションしながらインキュベーションした。インキュベーション後、遠心分離（15000g, 20 min, 4°C）を行い、上澄みを核リッチなサンプルとして使用した。

#### F. ウェスタンブロッティング

サンプルは 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis）によって分子量ごとに分離された。泳動は 20 mA/ゲル、室温（22-24°C）下で行った。

泳動終了後、トランスファー装置（Criterion, Bio Rad, USA）を用いてタンク式ブロッティングを行った。陽極側からトランスファー溶液（56 mM Tris, 39 mM Glycine, 0.0376% SDS, 15% methanol）に浸したパット、ろ紙（filter paper, ATTO, Japan）を 1 枚、ポリフッ化ビニリデン膜（PVDF 膜; polyvinylidene difluoride membranes, ATTO, Japan）、泳動後のゲル、トランスファーバッファーに浸したろ紙 1 枚、パットを順に重ねて、ブロッティングを開始した。なお、メンブレンは約 30 秒間メタノール（Wako, Japan）で湿潤させた後、トランスファー溶液に 30 分以上浸潤させた。転写条件は、100 V の定電圧、60 分間の転写時間とした。メンブレンの洗浄には TBS-T（0.1% Tween-20, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4）を使用した。転写後のメンブレンを 10 分間 TBS-T で振盪させ、4% ブロックエースを用いてブロッキングを行った。ブロッキングは室温で 60 分間行った。一次抗体はブロッキング溶液を用いて 500 倍に希釈し、4°C で一晩振盪させながらインキュベートした。PPAR $\alpha$  の一次抗体は Rabbit polyclonal



antibody to PPAR $\alpha$  (sc-9000, Santa cruz, USA) を、PPAR $\delta$  の一次抗体は Rabbit polyclonal antibody to PPAR $\delta$  (PA1-823A, Thermo scientific, USA) を Lamin A/C の一次抗体は Rabbit polyclonal antibody to Lamin A/C (sc-20681, Santa cruz, USA) を用いた。2 次抗体は Anti-rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (Peroxidase-Linked Secondary Antibodies, GE healthcare, England) を TBS-T を用いて 2500 倍に希釈し、室温で 1 時間振盪させながらインキュベートした。検出にはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase) を基質として反応させる ECL (Enzymatic Chemiluminescence) 法を用いた。

#### G. メンブレンの画像解析と定量

蛍光発光は化学発光イメージシステム MicroChemi (Berthold Technologies, USA) を用いてグレースケールデータとして画像を取り込んだ。取り込んだデジタル画像は、Image J (ver. 1.43, NIH, USA) を用いて定量分析した。グレースケール画像はソフトが有する濃度階調特性 (最大 16 bit) 中にある濃度で画素を形成する。定量数値として用いた値は選択した範囲におけるグレー値の濃度の合計であった。本研究において検出したバンドは、選択した範囲のグレー値と同じ面積のバックグラウンドを差し引いた値とした。各サンプルのタンパク質検出量の単位は Arbitrary Unit (AU) に設定した。

#### H. 統計処理

全ての統計量は平均値  $\pm$  SD で表した。異なる培養条件間におけるタンパク質量の比較には、繰り返しのない一元配置の分散分析を行い、平均値に有意差が認められた場合には Tukey-Kramer の post-hoc テストを行った。なお、有意水準は 5%未満とした。

### 3. 結果

#### A. PPAR $\alpha$ に対する MCFA およびケトン体の結合評価

Figure VI-2 には PPAR $\alpha$  における各脂肪酸の蛍光強度比をそれぞれ示した。PPAR $\alpha$  における蛍光強度比 (520 nm/495 nm) の増加はデカン酸 (C10:0)、ドデカン酸 (C12:0) およびミリスチン酸 (C14:0) 以外の各脂肪酸においてみられた。3 種類の MCFA のうち、オクタン酸のみが僅かながら PPAR $\alpha$  において蛍光強度比の増加を示した。UFA である  $\gamma$  リノレン酸と 3 種類の MCFA の蛍光強度比の最大振幅値を算出した (Figure VI-3)。その結果、オクタン酸の最大振幅値は  $\gamma$  リノレン酸と比較すると有意に低値を示したが、デカン酸およびドデカン酸よりも有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。Table VI-2 には、PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  に対する MCFA を含めた各脂肪酸の 50%効果濃度 (EC50: half maximal effective concentration) を示した。EC50 は薬物や抗体などが最低値からの最大反応の 50%を示す濃度を表し、EC50 値は PPARs に対する結合基質の親和性を間接的に表している。PPAR $\alpha$  アゴニストである GW7674 および  $\gamma$  リノレン酸 (C18:3) において、PPAR $\alpha$  の蛍光強度比の上昇がみられた脂肪酸、ステアリン酸 (C18:0)、パルミチン酸 (C16:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、オクタン酸 (C8:0) およびヘキサン酸 (C6:0) と比較して有意に EC50 値が低かった ( $p < 0.05$ )。また、ケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸による PPAR $\alpha$  の蛍光強度比は変化しなかった (Figure VI-2, Table VI-2)。

#### A. PPAR $\delta$ に対する MCFA およびケトン体の結合評価

Figure VI-4 には PPAR $\delta$  における各脂肪酸の蛍光強度比をそれぞれ示した。PPAR $\delta$  における蛍光強度比の増加は、パルミチン酸 (C16:0)、ステアリン酸 (C18:0) および  $\gamma$  リノレン酸 (C18:3) においてみられた。3 種類の MCFA を含む他の脂肪酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸における PPAR $\delta$  の蛍光強度比は変化しなかった。PPAR $\delta$  アゴニストである GW501516 およ

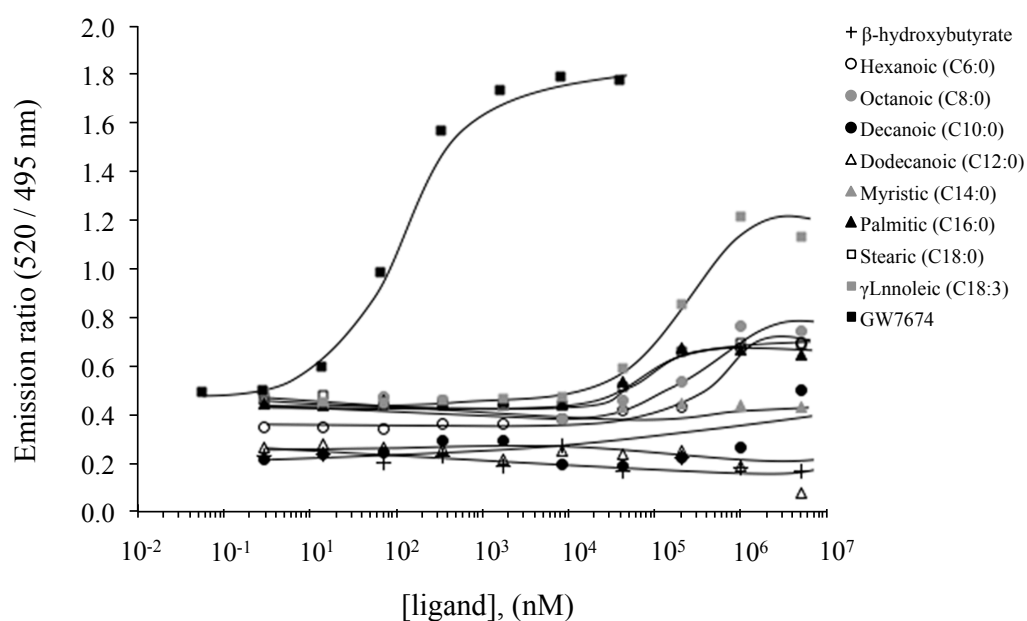


Figure VI-2. Ligand-induced binding of a coactivator derived peptide to PPAR $\alpha$  in vitro. GW7674, fatty acids and ketone body were used at the concentrations indicated. Results are expressed as the ratio of fluorescence intensity at 520 nm (fluorescein emission excited by terbium emission) and 495 nm (terbium emission). PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

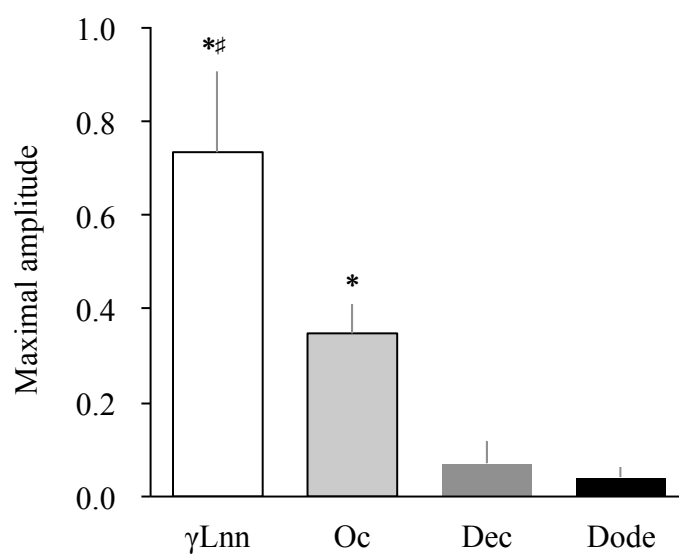


Figure VI-3. The maximum amplitude of emission ratio in PPAR $\alpha$ . Data represent mean  $\pm$  SD (n = 5). \*: p < 0.05 vs. Dec and Dode, #: p < 0.05 vs.  $\gamma$ Lnn.  $\gamma$ Lnn,  $\gamma$ Linoleic acid; Oc, octanoic acid; Dec, decanoic acid; Dode, dodecanic acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

Table VI-2. EC50 values (nM) for binding of agonist, fatty acids and ketone body to PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$ .

Fatty acid	PPAR $\alpha$	PPAR $\delta$
$\beta$ -hydroxybutyrate	N.C.	N.C.
Hexanoic (C6:0)	$6.3 \pm 0.2 \times 10^{6*#}$	N.C.
Octanoic (C8:0)	$5.6 \pm 0.1 \times 10^{6*#}$	N.C.
Decanoic (C10:0)	N.C.	N.C.
Dodecanoic (C12:0)	N.C.	N.C.
Myristic (C14:0)	N.C.	N.C.
Palmitic (C16:0)	$5.7 \pm 0.5 \times 10^{5*#}$	$2.4 \pm 0.9 \times 10^{5*#}$
Stearic (C18:0)	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{5*#}$	$2.1 \pm 0.5 \times 10^{5*#}$
$\gamma$ -Lnnoleic (C18:3)	$4.1 \pm 0.2 \times 10^{3*}$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{4*}$
GW7674	$6.2 \pm 0.4 \times 10$	-
GW501516	-	$10.3 \pm 3.6 \times 10$

Data represents mean  $\pm$  SD (n = 6). \*: p < 0.05 vs. GW7674 or GW501516, #: p < 0.05 vs.  $\gamma$ -Lnnoleic. EC50, half maximal effective concentration; N.C., no change; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

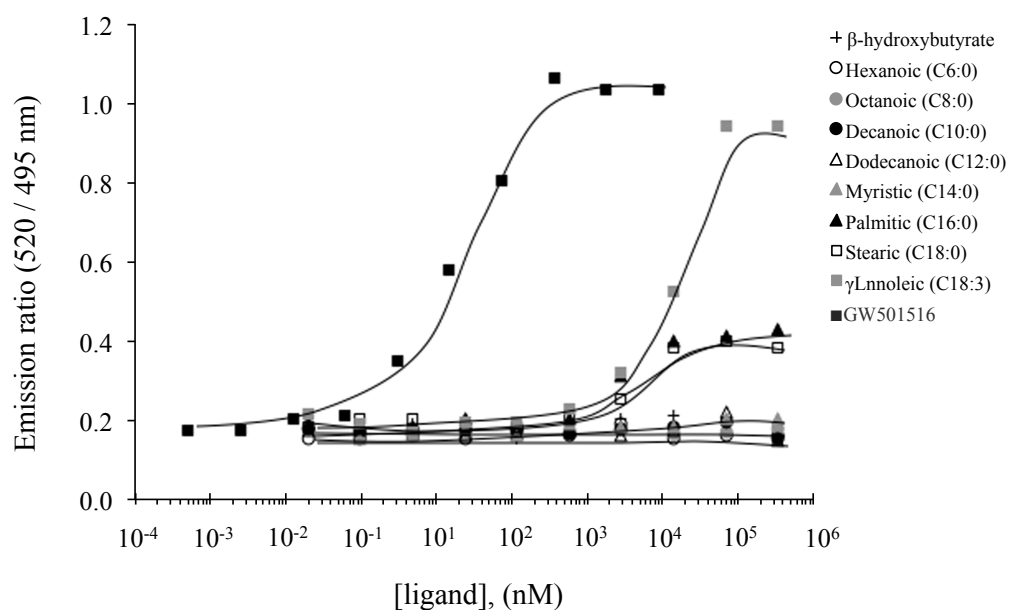


Figure VI-4. Ligand-induced binding of a coactivator derived peptide to PPAR $\delta$  in vitro. GW501516 and fatty acids and ketone body were used at the concentrations indicated. Results are expressed as the ratio of fluorescence intensity at 520 nm (fluorescein emission excited by terbium emission) and 495 nm (terbium emission). PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

び $\gamma$ リノレン酸において、パルミチン酸 (C16:0)、ステアリン酸 (C18:0) と比較して有意に PPAR $\delta$  における EC50 値が低かった (Table VI-2;  $p < 0.05$ )。

#### C. オクタン酸添加による PPARs タンパク質の変化

オクタン酸によって PPAR $\alpha$  に対する蛍光強度比の上昇がみられたことから、骨格筋細胞においてオクタン酸添加は PPARs タンパク質を増加させるのか検証した。その結果、オクタン酸添加によって骨格筋細胞の PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  タンパク質は両方ともに変化しなかった (Figure VI-5)。

### 4. 考察

MCFA による PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  に対する結合の有無を検証するため、実験 III では MCFA による PPARs に対するコアクチベーターの動員の有無を検証した。その結果、オクタン酸 (C8) は PPAR $\alpha$  に対して LCFA と比較すると低い結合親和性を示した。しかしながら骨格筋細胞においてオクタン酸は PPARs タンパク質を変化させなかった。さらにデカン酸や $\beta$ -ヒドロキシ酪酸において PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  に対する蛍光強度比の増加は示されなかった。これらの結果は、本実験の仮説に反して MCFA およびケトン体は PPARs に対して結合しないことを示唆している。

#### A. LCFA による PPARs に対する結合評価

本実験において LCFAs は PPARs に対して結合することを示した。PPARs は LCFAs およびエイコサノイド代謝産物の結合によって活性化されて、脂肪酸の酸化および合成に関与する遺伝子発現を制御している

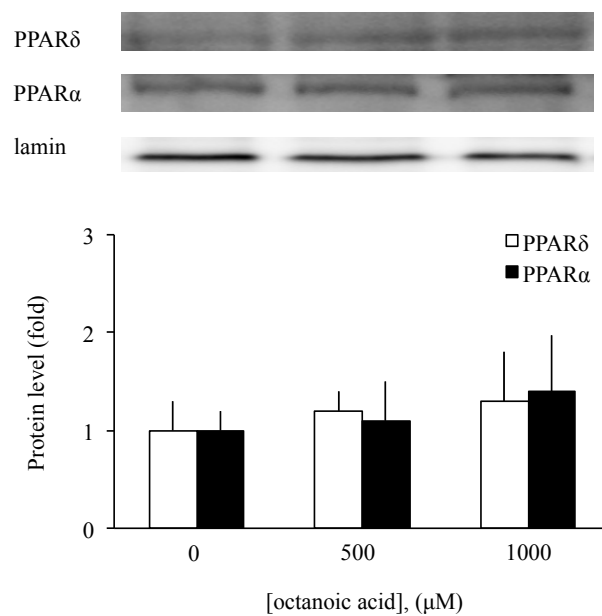


Figure VI-5. PPAR $\delta$  ( $\square$ ) and PPAR $\alpha$  ( $\blacksquare$ ) proteins of C2C12 cell treated with octanoic acid. Data represent mean  $\pm$  SD (n = 3). PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.



(Wang et al., 2003)。UFAs、特に PUFA は内因性の PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  のリガンド として *in vitro* における結合評価法によって同定されている (Xu et al., 1999)。しかしながらこの方法は、PPARs に対して脂肪酸が結合するか否かを評価した方法であり、リガンド結合後の PPARs の構造変化によって PPARs に対してコアクチベーターが動員されたかについては不明である。そこで、本実験では TR-FRET PPARs コアクチベーターアッセイ法を用いて、LCFA による PPARs に対するコアクチベーターの動員を評価した。その結果、炭素数 14 以外の LCFAs は PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  のコアクチベーターを動員させ、特に他の LCFAs と比較して UFA である  $\gamma$  リノレン酸における EC50 値が有意に低かった。これらの結果は、LCFAs は PPARs のリガンドとして作用してコアクチベーターの動員を促すことを示唆している。さらに LCFA のうち UFA において PPARs に対する結合親和性が他の LCFA よりも高い可能性を示唆している。

#### B. MCFA およびケトン体による PPARs に対する結合評価

本実験では、仮説と反して MCFA は PPARs に対して結合しないことを示唆した。Xu et al. (1999) は PPARs に対する各脂肪酸の結合をシンチレーションプロキシミティアッセイ法 (SPA; scintillation proximity assay) によって検証した結果、SFA (パルミチン酸, IC50: 7.4  $\mu$ M) よりも UFA ( $\gamma$  リノレン酸, IC50: 0.8  $\mu$ M) の方が PPAR $\alpha$  に対する結合親和性が高いことを示唆している。これまで、脂肪酸の不飽和度による PPARs に対する結合の違いは示されているが (Xu et al., 1999)、脂肪酸の鎖長の違いによる PPARs の作用に関する研究は報告されていない。本実験 I、II ではデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリアを増加させることを示したことから、その機序に PPARs が関与しているという仮説

の下、本実験を検証した。本実験によって MCFA のうちオクタン酸のみにおいて PPAR $\alpha$  に対して蛍光強度比の増加が僅かながらみられたが、その EC50 値は他の LCFA と比較すると非常に高い値を示した。さらに、オクタン酸添加によって骨格筋の PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  タンパク質の変化を検証した結果、両方のタンパク質はオクタン酸添加によって変化しなかった。これらの結果から、TR-FRET アッセイで得られたオクタン酸による PPAR $\alpha$  の結合は、生体内においては遺伝子発現を誘導するには不十分である可能性が推測される。また  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸において PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  に対する蛍光強度比の増加は示されなかった。これらの結果から、本実験の仮説に反して、全ての MCFA およびケトン体は PPARs に対して結合しないことを示唆した。実験 I、II では MCFA によって骨格筋のミトコンドリアが増加することを示唆したが、その機序に PPARs は関与していないことが推測される。今後は、MCFA やケトン体によるミトコンドリア増加機序に関して、PPARs 以外の他の転写因子との相互作用を検討する必要がある。

## 5. 要約

本実験は PPARs に対してデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が結合することによってミトコンドリアタンパク質の発現を制御しているという仮説を検証した。PPARs に対するデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の結合の有無を検証した結果、仮説に反してデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は PPARs に結合しないことが示唆された。これらの結果から、MCFA やケトン体による骨格筋ミトコンドリアの増加機序に PPARs は関与していないことが推測された。

## VIII. 討論

脂肪酸は炭素鎖長や不飽和度の違いといった構造の多様性に富み、脂肪酸の機能も非常に多彩である。近年、骨格筋に取り込まれた LCFA や不飽和度の異なる USFA は核内受容体 PPARs に結合して (Xu et al., 1999)、ミトコンドリア関連遺伝子発現を制御していることが明らかになっており (Hancock et al., 2008)、脂肪酸の新規機能として注目されている。しかしながら、LCFA よりも炭素数の少ない MCFA がもたらす骨格筋ミトコンドリア関連遺伝子の変化についてはこれまで明らかとなっていない。また脂肪酸の二重結合の数が多いリノレン酸 ( $IC_{50}$ :  $0.8 \mu M$ ) はパルミチン酸 ( $IC_{50}$ :  $9.6 \mu M$ ) よりも PPAR $\delta$  に対して高い結合親和性を示すが (Xu et al., 1999)、脂肪酸の鎖長が LCFA よりも短い MCFA による PPARs の結合に関しては明らかとなっていない。そこで本研究では MCFA による骨格筋ミトコンドリアタンパク質の変化と、MCFA が PPARs に対して結合するのかについて検証した。

### 1. MCFA 脂質食による骨格筋ミトコンドリア生合成

持久性トレーニングによる骨格筋の重要な適応はミトコンドリアの密度やミトコンドリア酸化関連酵素活性の亢進であることは古くから言われている (Holloszy et al., 1976)。さらに近年、運動を行った場合と同じように骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発する効果が得られる食品成分がいくつか発見されている。Miller et al. (1983) はラットに 5 週間にわたって LCFA 脂肪食を摂取させたところ、普通食と比較して骨格筋のミトコンドリア関連酸化酵素の活性が増大して、さらにトレッドミル走での疲労困憊に至るまでの時間が延長したことを報告している。このよ

うに骨格筋ミトコンドリア生合成の適応は運動トレーニングだけでなく、脂質摂取によっても生じることがいくつかの研究によって支持されている (Hancock et al., 2008; Han et al., 1997; Miller et al., 1983)。しかしながら長期にわたる LCFA 脂質食の摂取は体脂肪の蓄積やインスリン抵抗性を誘発するため (Han et al., 1997)、生理学的に必ずしも有効な栄養摂取方法とはいえない。Bach et al. (1996) は、LCFA よりも炭素数の少ない MCFA は体脂肪の蓄積を誘発させないことを報告している。MCFA と LCFA の消化吸收経路は大きく異なっているが (Bach et al., 1996, 1982; Greenberger et al., 1966)、MCFA と LCFA は共に骨格筋のエネルギー源として利用される (Bach et al., 1996)。LCFA は骨格筋においてエネルギー源として利用されるだけでなく、ミトコンドリア遺伝子発現を制御するシグナル分子としても作用する。一方で、MCFA に関する研究は LCFA と比較すると非常に少なく、MCFA が骨格筋ミトコンドリア生合成を誘発させる分子として作用するのかについては明らかとなっていない。そこで本研究ではまず、MCFA 脂質食はラット骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させるのかについて検証した。その結果、遅筋線維および速筋線維共に MCFA 脂質食は CS 活性を亢進させ、ミトコンドリア生合成を誘発させることを示唆した (実験 I; Figure IV-1)。さらに、MCFA 脂質食は LCFA 脂質食よりも  $\beta$  酸化を亢進させる可能性も示された (実験 I; Figure IV-2)。これらの結果から、MCFA は LCFA と同様に骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させるシグナル分子として作用することを示唆した。さらに、先行研究と一致して、MCFA 脂質食は体脂肪の蓄積を誘発させないことも示された (実験 I; Table IV-2)。したがって、MCFA 脂質食による効果はミトコンドリア適応だけでなく体脂肪の蓄積を誘発させないことから、生理学的に MCFA 脂質食は LCFA 脂質食よりも有益な

栄養摂取方法である可能性を示した。

## 2. デカン酸およびケトン体による骨格筋ミトコンドリア生合成

MCFA の摂取後、様々な消化吸収を経て骨格筋へ MCFA が取り込まれる (Bach et al., 1996)。そのため、実験 I で示唆した MCFA 脂質食による骨格筋のミトコンドリア生合成に対して MCFA が作用したのかについては推測の域を出ない。そこで本研究では骨格筋培養細胞を用いて、オクタン酸、デカン酸およびドデカン酸の MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させるのかについて検証した。その結果、炭素数 10 のデカン酸のみがコントロールと比較してミトコンドリア生合成を誘発した (実験 II; Figure V-3)。100  $\mu$ M、250  $\mu$ M および 500  $\mu$ M のデカン酸濃度で COXIV タンパク質が、100  $\mu$ M、250  $\mu$ M、500  $\mu$ M および 1000  $\mu$ M のデカン酸濃度で VDAC タンパク質がコントロールと比較して増加した (実験 II; Figure V-3)。安静時、骨格筋組織において脂肪酸は 100 ~ 150  $\mu$ M 程度含まれている (Baranowski et al., 1998)。したがって、骨格筋に存在していると推測される 100  $\mu$ M のデカン酸濃度においてもコントロールと比較してミトコンドリア関連タンパク質が増加したことから、生体内においてもデカン酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる基質として作用している可能性は十分に考えられる。

また、MCFA の摂取後、一部の MCFA はその構造を維持したまま骨格筋へ取り込まれるが、一部、肝臓において MCFA がケトン体へ変換されて、ケトン体が骨格筋のエネルギー源として取り込まれる (Bach et al., 1982)。したがって、MCFA だけでなく、ケトン体も骨格筋ミトコンドリアを増加させる基質として作用している可能性がある。本研究では、ケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸添加によって骨格筋細胞のミトコンド

リアタンパク質が増加するのかについて検証した。その結果、250～1000  $\mu\text{M}$   $\beta$ -ヒドロキシ酪酸はミトコンドリア生合成を誘発した(実験 II; Figure V-5)。Xu et al. (2010) によって、MCFA 脂質食を摂取するとケトン体の産生が高まり、ケトン体が骨格筋のエネルギー源として取り込まれることが報告されている。本実験 I では MCFA を摂取した際に  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸がどの程度産生されて骨格筋へ取り込まれているのかは不明であるが、MCFA による骨格筋ミトコンドリアの増加は MCFA であるデカン酸だけでなく、ケトン体の  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によっても誘導されている可能性を示唆する。

以上の結果から、MCFA 脂質食によるミトコンドリア生合成はデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によって誘発されていることが推測された。しかしながら、この結果は細胞レベルで得られた知見であることから、個体レベルにおいてもデカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸はミトコンドリア生合成を誘発させるのかについて今後、検証する必要がある。

### 3. MCFA およびケトン体による PPARs への非結合

LCFA による骨格筋のミトコンドリア生合成は LCFA が核内において PPARs に対して結合することによって誘発される (Xu et al., 1999)。本研究ではデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる基質であることが明らかとなった。しかしながら、これらの基質が PPARs に対して結合するのかについては報告されてなく、どのような機序によってデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させたのかについては説明できない。そこで、本研究では、デカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が PPARs に結合することによって骨格筋ミトコンドリア生合成を誘発させるという仮説を検証した。その結

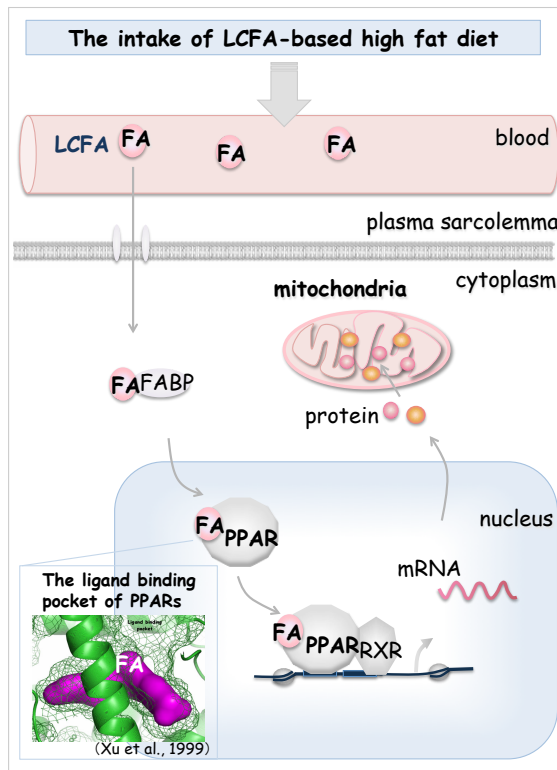
果、仮説に反してデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は PPARs に対して結合しないということが示唆された(実験 III)。骨格筋において主に PPAR $\delta$  が、次いで PPAR $\alpha$  が発現しており、ミトコンドリア関連遺伝子を含む標的遺伝子の転写制御に関与している (Stephenson et al., 2012)。これまで、PPARs と LCFA との結合の有無に関しては確認されているが (Xu et al., 1999)、MCFA をターゲットとして PPARs との相互作用を評価した研究は非常に少ない。本実験 III では、MCFAs のうちオクタン酸のみが PPAR $\alpha$  に対するコアクチベーターの動員を促すことを示したが、オクタン酸の PPAR $\alpha$  における EC50 値は 5.6 mM であり、 $\gamma$  リノレン酸 (EC50: 4.1  $\mu$ M) と比較すると非常に高い値を示した (実験 III; Figure VI-2, 3, Table VI-2)。実際に、骨格筋培養細胞を用いてオクタン酸添加を行ったところ、PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  タンパク質 (実験 III; Figure VI-5) やミトコンドリア関連タンパク質 (実験 II; Figure V-2) は変化しなかった。つまり、これらの知見から、オクタン酸が PPAR $\alpha$  に結合しても遺伝子発現を誘導させるまでには至らない非常に低い結合親和性であることが推測される。以上の結果から、本研究ではデカン酸や  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によって骨格筋のミトコンドリア生合成が誘発されることを示唆したが、その機序に PPARs は関与しないことが示唆された。

#### 4. MCFA およびケトン体によるヒストンアセチル化

本研究の結果からは、どのような機序でデカン酸や  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させているのか明らかにすることはできなかった。今後は、デカン酸や  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によるミトコンドリア増加機序に対して、PPARs 以外の他の転写因子との相互作用を検討する必要がある。近年、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸はヒストン脱アセチル化

### A. Existing concept

<The mitochondrial biogenesis by LCFA>



### B. New concept

<The mitochondrial biogenesis by MCFA and KB>

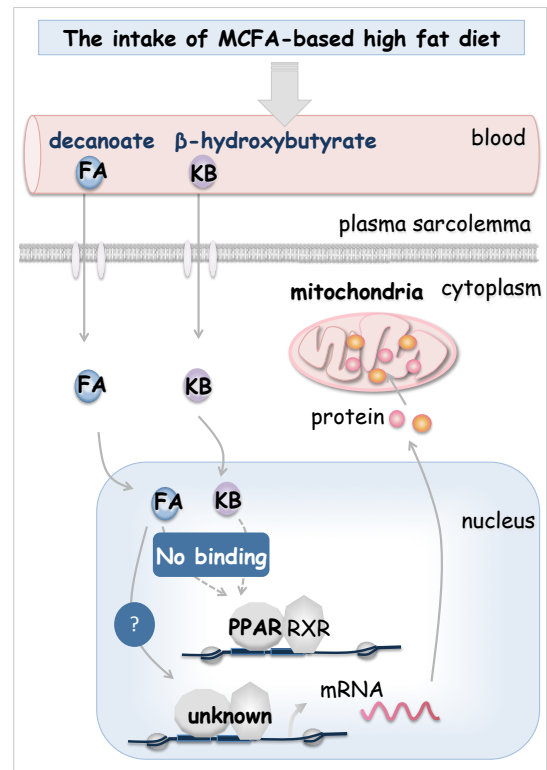


Figure VI-6. The mechanism of mitochondrial biogenesis by LCFA, MCFA and KB. A: Feeding a LCFA-based diet was found to induce an increase in mitochondrial biogenesis in muscles by activating the PPARs of nuclear transcription factors. B: This present study demonstrates that MCFAs-based high fat diet increase mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Moreover, decanoic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate increased mitochondrial protein expression. However, decanoic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate do not bind PPARs *in vitro*. Thus, this study concluded that decanoic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate enhance mitochondrial biogenesis in skeletal muscle independently of PPAR interaction. FA, fatty acid; FABP, fatty acid binding protein; KB, ketone body; LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; PPARs, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoic acid receptor.



酵素 (HDAC; histone deacetylase) の阻害剤として作用して、ヒストンのアセチル化を増加させることが報告され、ケトン体による新たな遺伝子発現機序が明らかとなった (Shimazu et al., 2013)。ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を「ON」にする。Candido et al. (1978) によって、短鎖脂肪酸である酪酸もヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として作用して、ヒストンのアセチル化を増加させることが報告されている。さらに近年、Galmozzi et al. (2013) によって、HDAC 阻害剤は C2C12 細胞において PGC-1 $\alpha$  のプロモーター上のヒストンアセチル化を増加させて PGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現を誘導し、ミトコンドリアタンパク質を増加させることが明らかとなった。 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸や酪酸によるヒストンのアセチル化が骨格筋のミトコンドリアを増加させるという知見は未だ報告されていないが、本研究で得られた  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸やデカン酸による骨格筋のミトコンドリア生合成はヒストンのアセチル化が関与している可能性も考えられる。今後の検討課題として、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸やデカン酸が骨格筋において HDAC の阻害剤として作用するのか、さらにその作用によってミトコンドリア生合成を誘発させるのかについて検証して、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸やデカン酸による骨格筋ミトコンドリア生合成の機序を明らかにする必要がある。

以上のように、本研究では運動栄養学的な観点から MCFA による骨格筋ミトコンドリア生合成の作用を検証した。その結果、LCFA 脂質食と同様に MCFA 脂質食によっても骨格筋ミトコンドリア生合成が誘発され、さらにミトコンドリア生合成を促す基質としてデカン酸と  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が同定された。また、LCFA とは異なり、これらの基質による骨格筋ミトコンドリア生合成に PPARs は関与しないことを示唆した。し

たがって、MCFA は LCFA と同様に遺伝子発現を制御するシグナル分子として作用することを示しており、ミトコンドリア遺伝子発現の様相は同一でも脂肪酸鎖長の違いによって遺伝子発現のシグナル経路に違いがもたらされることが示唆された (Figure VI-6)。

## IX. 総括

本研究では MCFA によるミトコンドリア生合成を検証するために、MCFA による骨格筋ミトコンドリアタンパク質の変化を検証して、PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合の有無を検証した。

各実験から得られた主な知見は以下の通りである。

### 1. MCFA 脂質食によるラット骨格筋ミトコンドリア関連酵素の増加 (実験 I)

実験 I では MCFA 脂質食による骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性および細胞質における H-FABP の変化を検証した。その結果、骨格筋におけるミトコンドリア関連酵素活性は MCFA 脂質食によって普通食と比較して増加した一方で、H-FABP 含量は MCFA 脂質食によって変化しなかった。また、MCFA 脂質食は体脂肪蓄積やアディポネクチン分泌異常を誘発させなかった。これらの結果から MCFA 食は体脂肪の蓄積を引き起こさずに、骨格筋ミトコンドリア生合成を誘発することを示唆した。

### 2. MCFA による骨格筋細胞のミトコンドリア系タンパク質の変化 (実験 II)

実験 II では、3 種類の MCFA と、MCFA の中間代謝産物であるケトン体のうちどの基質が骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質を増加させるのかについて検証した。その結果、デカン酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が骨格筋細胞の COX-IV および VDAC タンパク質含量を増加させ

た。これらの結果はデカン酸および $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発することを示唆した。

### 3. PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価（実験Ⅲ）

本実験Ⅲでは、PPARs に対して MCFA およびケトン体が結合することによってミトコンドリアタンパク質の発現を制御しているという仮説を検証するために、PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合の有無を検証した。その結果、仮説に反して MCFA およびケトン体は PPARs に対して結合しないことを示唆した。

以上のことから、本研究では MCFA 脂質食によるミトコンドリア生合成はデカン酸と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸によって生じていることを示唆した。さらに、LCFA とは異なり、これらの基質による骨格筋のミトコンドリア生合成に対して PPARs は関与しないことを示唆した。以上のことから、MCFA による骨格筋のミトコンドリア生合成に対して LCFA とは異なる機序を経ていることを示唆して、脂肪酸の鎖長の違いは遺伝子発現経路に違いをもたらすことを示している。しかしながら、MCFA によるミトコンドリア遺伝子発現機序に関しては未だ不明であり、今後、詳細に検証する必要がある。

## 謝辞

本研究の一部は、日本科学協会笹川科学研究助成および公益財団法人ヤマハ発動機スポーツ振興財団スポーツチャレンジ研究助成によって遂行された。

本論文の執筆にあたり、終始懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました金沢大学人間科学系 増田和実 教授に甚大なる感謝の意を表します。奈良教育大学教育学部保健体育講座 中谷昭 教授、畿央大学健康科学部看護医療学科 坂田進 教授には参考論文に関して多大なるご指導を賜りましたこと深く感謝申し上げます。立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構 岩中伸壮 研究員、同志社大学スポーツ健康科学部スポーツ健康学科 高倉久志 助教および首都大学東京人間健康科学研究科 古市泰郎 助教からも実験手法に関するご指導ご助言を賜りました。深厚なる謝意を表します。また、金沢大学大学院自然科学研究科 山田達也 氏および Hamidie Daniel Ronald 氏には日々のご指導ご鞭撻を賜りましたこと心より深く感謝致します。最後に、本稿執筆にあたり多大なるご協力をいただきました増田研究室の皆様にお礼申し上げます。

## 参考文献

- Abumrad, N., Coburn, C. and Ibrahimi, A. (1999) Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 4-13.
- Ariano, M. A., Edgerton, V. R. and Armstrong, R. B. (1973) Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 51-55.
- Armstrong, R. B. and Phelps, R. O. (1984) Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171: 259-272.
- Baar, K. (2004) Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 269-273.
- Babayan, V. K. (1968) Medium-chain triglycerides their composition, preparation, and application. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 23-25.
- Bach, A. C. and Babayan, V. K. (1982) Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 950-962.
- Bach, A. C., Ingenbleek, Y. and Frey, A. (1996) The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J. Lipid Res.* 37: 708-726.
- Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S. and Pette, D. (1969) Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem.* 10: 198-206.
- Bloom, B., Chaikoff, I. L., Reinhardt, W. O. and Dauben, W. (1951) Participation of phospholipides in lymphatic transport of absorbed fatty acids. *J. Biol. Chem.* 189: 261-267.
- Booth, F. W. (1980) Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 48: 23-28.
- Brand, M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 897-904.
- Candido, E. P. M. and Davie, J. R. (1978) Sodium butyrate cultured cells inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14: 105-113.
- Chang, W., Rickers-Haunerland, J. and Haunerland, N. H. (2001) Induction of cardiac FABP gene expression by long chain fatty acids in cultured rat

- muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 221: 127-132.
- Chau, C. A., Evans, M. J. and Scarpullat, C. (1992) Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the  $\gamma$ -subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor. *J. Biol. Chem.* 267: 6999-7006.
- Collatos, T. C., Edgerton, V. R., Smith, J. L. and Botterman, B. R. (1977) Contractile properties and fiber type compositions of flexors and extensors of elbow joint in cat: implications for motor control. *J. Neurophysiol.* 40: 1292-1300.
- Doenst, T., Nguyen, T. D. and Abel, E. D. (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 113: 709-724.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887.
- Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C. A., Hayes, N., Leibowitz, M. D., Moller, D. E. and Berger, J. (2000) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437: 431-437.
- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E. and Kozak, L. P. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90-93.
- Evans, R. M., Barish, G. D. and Wang, Y. X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10: 355-361.
- Galmozzi, A., Mitro, N., Ferrari, A., Gers, E., Gilardi, F., Godio, C. and Crestani, M. (2013) Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* 62: 732-742.
- Gan, Z., Burkart-Hartman, E. M., Han, D. H., Finck, B., Leone, T. C., Smith, E. Y. and Kelly, D. P. (2011) The nuclear receptor PPAR $\beta/\delta$  programs muscle glucose metabolism in cooperation with AMPK and MEF2. *Genes Dev.* 25: 2619-2630.
- Gan, Z., Rumsey, J., Hazen, B. C., Lai, L., Leone, T. C., Vega, R. B. and Kelly, D. P. (2013) Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J. Clin. Invest.* 123: 2564-2575.
- Garcia-Roves, P., Huss, J. M., Han, D. H., Hancock, C. R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M. and Holloszy, J. O. (2007) Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 10709-10713.

- Glatz, J. F., Schaap, F. G., Binas, B., Bonen, A., van der Vusse, G. J. and Luiken, J. J. (2003) Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 178: 367-371.
- Goffart, S., von Kleist-Retzow, J. C. and Wiesner, R. J. (2004) Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 64: 198-207.
- Gowda, K., Marks, B., Zielinski, T. and Ozers, M. (2006) Development of a coactivator displacement assay for the orphan receptor estrogen-related receptor- $\gamma$  using time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Anal. Biochem.* 357: 105-115.
- Greenberger, N. J., Rodgers, J. B. and Isselbacher, K. J. (1966) Absorption of medium and long chain triglycerides: factors influencing their hydrolysis and transport. *J. Clin. Invest.* 45: 217-227.
- Hamilton, J. A., Miller, K. W. and Small, D. M. (1983) Solubilization of triolein and cholesteryl oleate in egg phosphatidylcholine vesicles. *J. Biol. Chem.* 258: 12821-12826.
- Hancock, C. R., Han, D. H., Chen, M., Terada, S., Yasuda, T., Wright, D. C. and Holloszy, J. O. (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7815-7820.
- Han, D. H., Hansen, P. A., Host, H. H. and Holloszy, J. O. (1997) Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes* 46: 1761-1767.
- Holloszy, J. O. and Booth, F. W. (1976) Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38: 273-291.
- Holt, P. R. (1967) Medium chain triglycerides. A useful adjunct in nutritional therapy. *Gastroenterology* 53: 961-966.
- Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Cell* 18: 645-650.
- Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Takeuchi, H., Aoyama, T., Ohra, A., Harada, Y., Okazaki, M. and Kondo, K. (2002) Comparison of diet-induced thermogenesis of foods containing medium- versus long-chain triacylglycerols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 536-540.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O. and Olson, E. N. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797-801.



- Livesey, G. and Elia, M. (1988) Estimation of energy expenditure , and net fat oxidation calorimetry : evaluation of errors to the detailed composition of net carbohydrate and synthesis by indirect with special reference. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 608-628.
- Luquet, S., Lopez-soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M. and Grimaldi, P. A. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  controls muscle development and oxydative capability. *FASEB J.* 17: 2299-2301.
- Malapaka, R. R., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J. H., Zhou, X. E., Xu, Y. and Xu, H. E. (2012) Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.* 287: 183-195.
- Mattson, F. H. and Volpenhein, R. A. (1962) Rearrangement of glyceride fatty acids during digestion and absorption. *J. Biol. Chem.* 237: 53-55.
- McDonald, G. B., Saunders, D. R., Weidman, M. and Fisher, L. (1980) Portal venous transport of long-chain fatty acids absorbed from rat intestine. *Am. J. Physiol.* 239: 141-150.
- Metges, C. C. and Wolfram, G. (1991) Medium- and long-chain triglycerides labeled with  $^{13}\text{C}$ : a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J. Nutr.* 121: 31-36.
- Midaoui, A., Chiasson, J. L., Tancrède, G. and Nadeau, A. (2006) Physical training reverses the increased activity of the hepatic ketone body synthesis pathway in chronically diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E207-E212.
- Miller, W. C., Bryce, G. R. and Conlee, R. K. (1983) Adaptations to a high fat diet which increase exercise endurance in male rats. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 26: 78-83.
- Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M. and Fujitsuka, N. (1998) Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 113-122.
- Neufer, P. D., Farrar, R. P., Veerkampi, J. H. and Dohm, G. L. (1994) Transcriptional regulation of muscle fatty acid-binding protein. *Biochem. J.* 298: 613-617.
- Noguchi, O. and Takeuchi, H. (2002) Larger thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 524-529.
- Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E. and Jones, P. J. H. (1998) Medium

- chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.* 62: 1203-1215.
- Pi-Sunyer, F. X., Hashim, S. and Itallie, T. B. V. (1969) Insulin and ketone responses to ingestion of medium and long-chain triglycerides in man. *Diabetes* 18: 96-100.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M. and Kersten, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010: 20.
- Rieck, M. and Meissner, W. (2008) Ligand-mediated regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\beta/\delta$ : A comparative analysis of PPAR-selective agonists and all-trans retinoic acid. *Mol. Pharmacol.* 74: 1269-1277.
- Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. (2001) PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276: 37731-37734.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S. J., Vogel, R., Shinar, D. and Rodan, G. A. (1992) Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6: 1634-1641.
- Seaton, B., Welle, S., Warenko, M. and Campbell, R. (1986) Thermic effect of medium-chain triglycerides in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 630-634.
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N. and Verdin, E. (2013) Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339: 211-214.
- Simi, B., Sempore, B., Mayet, M. H. and Favier, R. J. (1991) Additive effects of training and high-fat diet on energy metabolism during exercise. *J. Appl. Physiol.* 71: 197-203.
- Small, D. M. (1991) The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 413-434.
- Staiger, H., Staiger, K., Haas, C., Weisser, M., Machicao, F. and Häring, H. U. (2005) Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. *Diabetologia* 48: 2115-2118.

- Stahl, A. (2004) A current review of fatty acid transport proteins. *Pflügers Arch.* 447: 722-727.
- Stephenson, E. J., Camera, D. M., Jenkins, T., Kosari, S., Lee, J. S., Hawley, J. and Stepto, N. K. (2012) Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic western diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302: E1541-E1549.
- Srere, P. A. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-11.
- Tai, T., Jennermann, C., Brown, K., Oliver, B., MacGinnitie, M., Wilkison, W. O. and Graves, R. (1996) Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor promotes brown adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 271: 29909-29914.
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y. and Sakai, J. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor induces fatty acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 15924-15926.
- Tsuji, H., Kasai, M., Takeuchi, H., Nakamura, M., Okazaki, M. and Kondo, K. (2001) Human nutrition and metabolism dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *J. Nutr.* 131: 2853-2859.
- Turner, N., Hariharan, K., Tidang, J., Frangioudakis, G., Beale, S. M., Wright, L. E. and Ye, J. (2009) Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. *Diabetes* 58: 2547-2554.
- Virbasius, C. A., Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C. (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* 7: 2431-2445.
- Wang, Y., Lee, C., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. and Jolla, L. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170.
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J. and Milburn, M. V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* 3: 397-403.
- Yang, C., Li, Q. and Li, Y. (2014) Targeting nuclear receptors with marine natural products. *Mar. Drugs* 12: 601-635.
- Yang, Y., Shang, W., Zhou, L., Jiang, B., Jin, H. and Chen, M. (2007) Emodin with PPARgamma ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 353: 225-230.

- Ye, F., Zhang, Z. S., Luo, H. B., Shen, J. H., Chen, K. X., Shen, X. and Jiang, H. L. (2006) The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPARgamma: bioassay with molecular modeling simulation. *Chembiochem*. 7: 74-82.
- Yue, L., Ye, F., Xu, X., Shen, J., Chen, K., Shen, X. and Jiang, H. (2005) The conserved residue Phe273 (282) of PPARalpha (gamma), beyond the ligand-binding site, functions in binding affinity through solvation effect. *Biochimie* 87: 539-550.
- Zhang, P., Liu, C., Zhang, C., Zhang, Y., Shen, P., Zhang, J. and Zhang, C. Y. (2005) Free fatty acids increase PGC-1 $\alpha$  expression in isolated rat islets. *FEBS Lett*. 579: 1446-1452
- Zonderland, M. L., Bär, P. R., Reijneveld, J. C., Spruijt, B. M., Keizer, H. and Glatz, J. F. (1999) Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol*. 79: 391-396.

#### 参考論文

- (1) **Ishizawa, R.**, Masuda, K., Sakata, S. and Nakatani, A. (2014) Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. J. Oleo Sci. accepted for publication.

#### 副論文

- (1) **石澤里枝**, 山田達也, Hamidie, D. R. Ronald, 増田和実. (2015) 脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構. 北陸体育学会紀要 accepted for publication. (総説)

# Effects of Different Fatty Acid Chain Lengths on Fatty Acid Oxidation-Related Protein Expression Levels in Rat Skeletal Muscles

Rie Ishizawa<sup>1,2</sup>, Kazumi Masuda<sup>3</sup>, Susumu Sakata<sup>4</sup> and Akira Nakatani<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Natural Sciences and Technology, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1192, Japan

<sup>2</sup> Department of Exercise Physiology, Nara University of Education, Nara, 630-8528, Japan

<sup>3</sup> Faculty of Human Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1192, and Japan

<sup>4</sup> Graduate School of Health Science, Kio University, Nara, 630-0832, Japan

**Abstract:** Skeletal muscles can adapt to dietary interventions that affect energy metabolism. Dietary intake of medium-chain fatty acids (MCFAs) enhances mitochondrial oxidation of fatty acids (FAO) in type IIa skeletal muscle fibers. However, the effect of MCFAs diet on mitochondrial or cytoplasmic FAO-related protein expression levels in different types of muscle fibers remains unclear. This study aims to examine the effects of a high-fat diet, containing MCFAs, on mitochondrial enzyme activities and heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) levels in different types of skeletal muscle fibers. Five-week-old male Wistar rats were assigned to one of the following three dietary conditions: standard chow (SC, 12% of calories from fat), high-fat MCFA, or high-fat long-chain fatty acids (LCFAs) diet (60% of calories from fat for both). The animals were provided food and water ad libitum for 4 weeks, following which citrate synthase (CS) activity and H-FABP concentration were analyzed. The epididymal fat pads (EFP) were significantly smaller in the MCFA group than in the LCFA group ( $p < 0.05$ ). MCFA-fed group displayed an increase in CS activity compared with that observed in SC-fed controls in all types of skeletal muscle fibers (triceps, surface portion of gastrocnemius (gasS), deep portion of gastrocnemius (gasD), and soleus;  $p < 0.05$ ). H-FABP concentration was significantly higher in the LCFA group than in both the SC-fed and MCFA-fed groups (triceps, gasS, gasD, and soleus;  $p < 0.05$ ). However, no significant difference was observed in the H-FABP concentrations between the SC-fed and MCFA-fed groups. The results of this study showed that the MCFA diet can increase the expression of the mitochondrial enzyme CS, but not that of H-FABP, in both fast- and slow-twitch muscle fibers, suggesting that H-FABP expression is dependent on the chain length of fatty acids in the cytoplasm of skeletal muscles cells.

**Key words:** MCFA diet, H-FABP, mitochondrial enzyme, rat skeletal muscle

## 1 INTRODUCTION

Lipids and long-chain fatty acids (LCFAs) are energy-rich compounds that play an important role in fatty acid (FA) metabolism. Over the past 20 years, it has been demonstrated that LCFAs act as signaling molecules regulating gene expression and that their target genes encode proteins having a role in FA transport and metabolism<sup>1,2</sup>. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP), also known as FABP3, was isolated from a wide range of tissues, including skeletal muscles<sup>3</sup>. In skeletal muscle cells, H-FABP facilitates the transport of FAs into the mitochondrial  $\beta$ -oxidation system<sup>4</sup>. The study has demonstrated that polyunsaturated LCFAs that are supplementary to the

diet can increase H-FABP protein levels in rat skeletal muscles<sup>5</sup>. Moreover, exposure to LCFAs can induce the expression of the *H-FABP* gene in L6 myoblasts<sup>6</sup>. Physio-

**Abbreviations:** ANOVA, one-way analysis of variance; CS, citrate synthase; EFP, epididymal fat pad; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FA, fatty acids; FAO, fatty acid oxidation; FG, fast-twitch glycolytic; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; H-FABP, heart-type fatty acid-binding protein; LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SC, standard chow; SO, slow-twitch oxidative.

\* Correspondence to: Akira Nakatani, Department of Exercise Physiology, Nara University of Education, Takabatake-cho, Nara-city, Nara, 630-8528, Japan

E-mail: akira@nara-edu.ac.jp

Accepted December 10, 2014 (received for review September 5, 2014)

Journal of Oleo Science ISSN 1345-8957 print / ISSN 1347-3352 online

<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jos/> <http://mc.manuscriptcentral.com/jjocs>

logical experiments showed that an increase in FA uptake and its metabolism results in both elevated H-FABP protein and mRNA levels in skeletal muscles, suggesting that FAs control *H-FABP* gene expression<sup>6,7)</sup>.

An important adaptation of muscle to endurance exercise is its ability to increase mitochondrial density and oxidative enzyme activity<sup>8)</sup>, the latter of which is associated with robust stimulation of mitochondrial biogenesis<sup>9)</sup>. Under the conditions of high-fat intake (45%–60% of calories derived from fat), in which LCFAs are available in excess, mitochondrial protein levels and FA oxidation (FAO)-related protein levels increase in both type I<sup>10)</sup> and type II<sup>11)</sup> skeletal muscle fibers, suggesting that a high-fat diet can enhance the capacity of mitochondrial FAO. In summary, It has been showed that LCFAs can increase the synthesis of FA metabolism-related proteins<sup>10, 11)</sup>. However, a diet rich in LCFAs induces widespread insulin resistance in skeletal muscles<sup>11, 12)</sup>. Given the close link between lipid accumulation and reduced insulin sensitivity, research on high-fat diet would provide the basis for a primary experimental paradigm to investigate the etiology of insulin resistance in rodents<sup>11, 12)</sup>.

Although LCFA-based high-fat diets, which contain saturated LCFAs, can lead to obesity and insulin resistance<sup>11, 12)</sup>, some studies suggested that medium-chain FAs (MCFAs), having a chain of 8–12 carbon atoms, have anti-obesity potential<sup>13, 14)</sup>. Compared with LCFAs, MCFAs have several unique nutritional and physiological properties. While LCFAs are first transported into the intestinal lymphatic ducts and then to the systemic circulatory system as chylomicrons, it is well documented that MCFAs are transported by the portal vein system to the liver where they are readily oxidized<sup>15)</sup>. Studies in both humans and rodents showed that MCFAs induce higher energy expenditure and FAO compared to that induced by LCFAs, which was associated with a smaller mass of adipose tissue<sup>14, 16)</sup>. These characteristics have resulted in MCFAs being considered as potential dietary supplements for prevention of obesity and diseases related to LCFA-based high-fat diets.

A previous study has demonstrated that MCFA-rich diets increase mitochondrial protein levels in skeletal muscle, suggesting that MCFAs can enhance muscle mitochondrial oxidative capacity<sup>17)</sup>. Skeletal muscle fibers can be classified into three categories: type I, type IIa, and type IIb. Type I fibers, which are rich in mitochondria and oxidative metabolic enzymes, show low contractile capacity. Type IIa and IIb fibers are characterized by glycolytic metabolism and fast contraction<sup>18)</sup>. MCFA-rich diets increase mitochondrial protein levels in type IIa gastrocnemius muscle (fast-twitch oxidative-glycolytic) fibers<sup>17)</sup>. However, it remains unclear whether oxidative enzyme concentrations in type I (slow-twitch oxidative) and type IIb (fast-twitch glycolytic) fibers are affected by MCFAs. While LCFAs could increase H-FABP protein levels in muscle cells<sup>6)</sup>, little is known re-

garding the effects of MCFAs on FAO-related protein concentrations in the cytoplasm of skeletal muscles. Therefore, this study aims to evaluate the effects of an MCFA-based high-fat diet on mitochondrial enzyme activity and H-FABP levels in both type I and type II skeletal muscle fibers in rats.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Experimental animals

The procedures conformed to the “Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in Academic Research Institutions” (published by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan) and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Nara University of Education. Five-week-old male Wistar rats were obtained from Japan SLC (Hamamatsu, Shizuoka, Japan). Animals, with an initial weight of 70–90 g, were provided ad libitum access to one of the following three diets for 4 weeks: a standard chow diet, MCFA-based high-fat diet, and LCFA-based high-fat diet. Of the total calories obtained from the standard chow diet, 23.5% is derived from proteins, 11.9% is derived from fats, and 64.5% is derived from carbohydrates. Of the total calories obtained from the high fat diet, 20.0% is derived from proteins (325 g/kg casein), 60.0% is derived from fats (LCFA-fed: 360 g/kg LCFAs oil or MCFA-fed: 324 g/kg MCFAs oil and 36 g/kg LCFAs oil), and 20.0% is derived from carbohydrates (25 g/kg corn starch, 180 g/kg sucrose, and 56 g/kg cellulose). The composition of dietary FAs is presented in **Table 1**. Both the high-fat diets contained 10 g of a vitamin mix, 35 g of a mineral mix, and 3 g of choline chloride per kg of diet.

### 2.2 Tissue collection

After 4 weeks of dietary treatment, the rats, fasted overnight, were anesthetized with an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight). The deep portion of gastrocnemius (gasD) type IIa fibers (56% fast-twitch glycolytic (FG) fibers, 38% fast-twitch oxidative glycolytic (FOG) fibers, and 4% slow-twitch oxidative (SO) fibers<sup>18)</sup>), surface portion of gastrocnemius (gasS) type IIa fibers (58% FG, 37% FOG, and 5% SO fibers<sup>18)</sup>), soleus type I fibers (0% FG, 19% FOG, and 89% SO fibers<sup>19)</sup>), and triceps type IIb fibers (63% FG, 22% FOG, and 15% SO fibers<sup>20)</sup>) were dissected out, clamp-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The epididymal fat pads (EFP) were collected and weighed.

### 2.3 Measurements of citrate synthase (CS) activity and H-FABP concentration

Muscle samples were homogenized in a HEPES-EDTA-

**Table 1** Fatty acid composition of two lipids.

Fatty acid*	Percentage	
	MCFAAs-diet	LCFAAs-diet
C6:0	0.9	—
C8:0	74.3	—
C10:0	14.7	—
C12:0	0.2	—
C14:0	—	—
C16:0	0.5	5.4
C18:0	0.2	2.1
C18:1	3.5	35.3
C18:2	4.8	48.2
C18:3	0.8	8.3
C20:0	0.1	0.5

MCFAAs, medium-chain fatty acids; LCFAAs, long-chain fatty acids. \*Two numbers following “C” denote the number of carbon atoms and the number of double bounds in fatty acid.

sucrose buffer (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, and 250 mM sucrose), using a ground-glass homogenizer. These homogenates were frozen and thawed three times and were mixed thoroughly before the measurements of enzymatic activity. For the H-FABP assays, an aliquot of the homogenate was centrifuged at  $700 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . As an index of oxidative enzyme activity, CS activity was measured using Srere's method<sup>21</sup>). H-FABP concentration was measured using an ELISA kit, according to the manufacturer's instruction (Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA, USA).

## 2.4 Measurements of leptin and adiponectin concentrations

Blood samples were obtained via cardiac puncture. The plasma leptin and adiponectin concentrations were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (leptin, Quantikine M: R&D system, Minneapolis, MN, USA; adiponectin, Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan).

## 2.5 Statistical Analysis

The data are expressed as mean  $\pm$  SE. Variables among groups were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey–Kramer post hoc test was conducted if the ANOVA indicated a significant difference. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3 RESULTS

### 3.1 Energy intake, body weight, epididymal fat pad (EFP) weight, plasma glucose, leptin, and adiponectin concentrations

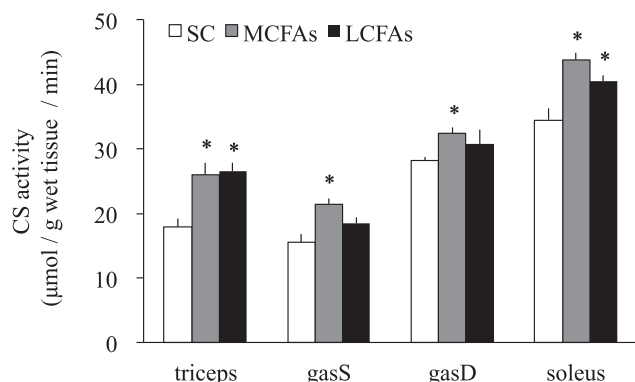
Upon completion of the 4-week feeding regimen, body weight was lower in rats fed with MCFA-based high-fat diet (MCFA group) than in rats fed with SC (SC group) and those fed with LCFA-based high-fat diet (LCFA group) (Table 2). As shown in Table 2, although there was no difference in daily energy intake between the SC and MCFA groups, the LCFA group expressed a prominent energy intake. Therefore, the LCFA group showed an increased EFP weight compared with that observed in the SC and MCFA groups (Table 2). The ratio of EFP weight to energy intake did not differ among the three groups (Table 2). Plasma glucose concentrations were significantly higher in the LCFA group than in the SC and MCFA groups (Table 2). Plasma leptin concentrations were significantly higher in

**Table 2** Body weight, Energy intake, EFP weight, EFP weight/Energy intake, plasma glucose, and adipocytokine concentrations in SC, MCFA and LCFA groups.

	SC	MCFA	LCFA
Body weight (g)	239 $\pm$ 2	216 $\pm$ 4*	244 $\pm$ 6 <sup>#</sup>
Energy intake (kcal/day)	87 $\pm$ 9	77 $\pm$ 6	109 $\pm$ 8* <sup>#</sup>
EFP weight (g)	2.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2* <sup>#</sup>
EFP weight/Energy intake (g $\cdot$ day/kcal)	2.6 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2
Plasma glucose (mg/dl)	202 $\pm$ 9	220 $\pm$ 25	269 $\pm$ 6* <sup>#</sup>
Plasma leptin (ng/dl)	0.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.4* <sup>#</sup>
Plasma adiponectin (ng/dl)	3.4 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1* <sup>#</sup>

Data represent the mean  $\pm$  SE of the values obtained from 5–7 rats. \* $p < 0.05$  vs. SC group; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. MCFA group. EFP, epididymal fat pad; LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; SC, standard chow.





**Fig. 1** Citrate synthase (CS) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (■) and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean  $\pm$  SE of the values obtained from 5-7 rats. \* $p < 0.05$  vs. SC group. LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; SC, standard chow.

the LCFA group than in the SC and MCFA groups (Table 2), and plasma adiponectin concentrations were significantly lower in the LCFA group than in the SC and MCFA groups (Table 2).

### 3.2 Mitochondrial enzyme activities

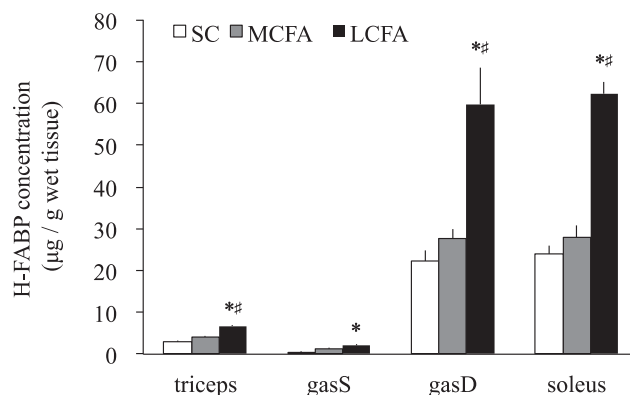
Mitochondria are well known as the major sites of lipid oxidation. Therefore, to examine whether intake of MCFA and LCFA induces a difference in the utilization of fatty acids in skeletal muscles, we measured the activity of the mitochondrial oxidative enzyme CS in the SC, MCFA, and LCFA groups. In soleus and triceps muscles, CS activity was significantly higher in the MCFA and LCFA groups than in the SC group (Fig. 1). In gasS and gasD muscles, CS activity was significantly higher in the MCFA group, but not in the LCFA group, compared to that in the SC group (Fig. 1). In gasS muscle, CS activity of the MCFA group showed a tendency to increase in comparison to that of the LCFA group ( $p = 0.09$ ).

### 3.3 Fatty acid-binding protein concentrations

H-FABP concentration in the muscles was significantly higher in the LCFA group than in the SC (triceps, gasS, gasD, and soleus) and MCFA (triceps, gasD, and soleus) groups (Fig. 2). In contrast, there was no significant difference in H-FABP concentrations between the SC and MCFA groups.

## 4 DISCUSSION

To examine the effects of dietary MCFAs on FAO-related protein expression, we measured mitochondrial enzyme activity and H-FABP concentration in rodent skeletal



**Fig. 2** Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) concentration in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (■), and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean  $\pm$  SE of the values obtained from 5-7 rats. \* $p < 0.05$  vs. SC group; # $p < 0.05$  vs. MCFA group. LCFA, long-chain fatty acid; MCFA, medium-chain fatty acid; SC, standard chow.

muscles after the 4-week feeding regimen of MCFA-based high-fat diet. The results showed that CS activity increased in both fast- and slow-twitch muscle fibers of MCFA-fed rats, without increased fat accumulation. LCFA-fed rats displayed increased H-FABP concentration in skeletal muscles, while H-FABP concentration did not change in rats fed with the MCFA-based high-fat diet. In view of these results, the intake of MCFAs can increase the expression level of mitochondrial enzyme proteins, but not that of H-FABP, in overall muscle and FAs, depending on their chain length, may induce distinctive FA-binding protein expressions in cytoplasm.

In this study, the MCFA-based diets caused an increase in mitochondrial oxidative enzyme activity in fast- and slow-twitch muscles. An important adaptation of muscle to endurance exercise is its ability to increase mitochondrial density and oxidative enzyme activity (e.g., CS activity)<sup>8</sup>, the latter of which is associated with robust stimulation of mitochondrial biogenesis<sup>9</sup>. Skeletal muscles that exhibit plasticity can adapt to nutritional interventions. Under the conditions of excess LCFA availability, mitochondrial content and FAO capacity are increased in skeletal muscles<sup>10, 11</sup>. Skeletal muscle fibers can be classified into one of the three categories on the basis of their morphological, contractile, and metabolic characteristics. Type I fibers, which are rich in mitochondria and oxidative metabolism enzymes, show low contractile capacity. Type II fibers (including IIa and IIb) are characterized by glycolytic metabolism and fast contraction<sup>22</sup>. It has been demonstrated that an LCFA-based high-fat diet feeding for 4 or 5 weeks can increase mitochondrial enzyme activity in type I<sup>10</sup> and type IIb muscle fibers<sup>11</sup>. Moreover, MCFA-rich diets also

increase mitochondrial protein levels in type IIa fibers of gastrocnemius muscle<sup>17</sup>). However it remains unresolved whether oxidative enzymes in type I (slow-twitch oxidative) and type IIb (fast-twitch glycolytic) muscle fibers are affected by MCFAs. While another study used an MCFA-diet that was rich in lauric acid (C12) and composed of 50% LCFAs<sup>17</sup>), we used a diet composed of 90% MCFAs, in which the percentage of caprylic acid (C8) was 74.3%. In this study, we measured the activity of the mitochondrial enzyme CS in the soleus type I fibers, gasD type IIa fibers, gasS type IIa fibers, and triceps type IIb fibers after the rats were fed with the MCFA- or LCFA-based diet for 4 weeks. In soleus, gasD, gasS, and triceps, the MCFA-group showed an increase in CS activity compared with that in the SC group. In gasS muscle, moreover, CS activity of the MCFA group expressed a tendency to increase in comparison to that of the LCFA group. This result suggested that the MCFA-based high-fat diet is a more potent inducer of muscle mitochondrial biogenesis than is the LCFA-based high-fat diet. In skeletal muscle, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ), a master regulator of mitochondrial biogenesis, was increased by LCFA-based high-fat diet feeding<sup>11</sup>). In addition, plasma FA levels elevated by LCFA-diet feeding were found to induce an increase in muscle mitochondrial biogenesis by activating peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), a family of nuclear transcription factors<sup>23</sup>). The molecular mechanism underlying MCFA diet-induced up-regulation of muscle mitochondrial biogenesis has not yet been clarified. It seems likely that the MCFA-based diet increases mitochondrial enzyme activity due to activation of PGC-1 $\alpha$ /PPARs and/or an increase in mitochondrial density in skeletal muscles.

To the best of our knowledge, the modulation of H-FABP expression by different lengths of FA chain in skeletal muscles has not been studied previously. We showed that treatment with the LCFA-based high-fat diet could increase H-FABP concentration in both fast- and slow-twitch muscle fibers. Interestingly, H-FABP concentration did not change in the skeletal muscles of rats fed with the MCFA-based high-fat diet. H-FABP might have a buffering action against the damaging accumulation of unbound free FAs in the intracellular environment. It has been demonstrated that changes in circulating hormone levels can affect the FABP concentration of specific animal tissues<sup>7, 24</sup>). Rats fed with the LCFA-based high-fat diet exhibited elevated levels of H-FABP protein in the liver and adipose tissues<sup>24</sup>). In addition, exposure to LCFAs was reported to increase expression of the *H-FABP* gene in L6 myoblasts<sup>6</sup>). Likewise, exposure to LCFAs and 9-cis-retinoic acid can increase the expression of the liver type *FABP* gene in hepatocytes<sup>25</sup>). Our results showed that the pathway of gene expression induced by MCFAs might be different from that induced by LCFAs. A family of nuclear transcription factors called

PPARs was shown to regulate the expression of genes involved in oxidative and FA metabolism upon its activation by FA or other ligands<sup>1, 2</sup>). LCFAs have a higher binding affinity for PPARs than MCFAs do<sup>1</sup>). However, it is not clear whether MCFAs specifically affect an oxidative or FA metabolic pathway or influence the activity of other transcription factors. Further studies will be necessary to elucidate the mechanisms underlying H-FABP expression induced by MCFAs and LCFAs.

In agreement with the findings of previous studies<sup>26, 27</sup>), we found that compared with the LCFA-based high-fat diet, the MCFA-based high-fat diet causes lesser accumulation of visceral fat. The lesser fat accumulation associated with MCFA-based diet is observed due to reduction in daily total energy intake because there is no difference in the ratio of EFP weight to energy intake between LCFA and MCFA groups. Compared with LCFA-based high-fat diet, MCFA-based high-fat diet was also reported to reduce daily food intake<sup>26</sup>). Obesity is a major public health concern and a major risk factor for insulin resistance. The typical western diet, which is rich in fats and calories is considered the primary cause of both accumulation of visceral fat and development of insulin resistance<sup>11, 12</sup>). Our above findings suggest that the MCFA-rich diet may prevent LCFA-derived fat accumulation. Moreover, blood glucose levels were lower in rats fed with the MCFA-rich diet than in rats that consumed the LCFA-rich diet. These results suggest that MCFAs accumulate less as body fat compared with LCFAs, which are the main components of general edible oils. In this study, the secretion of adipocytokines could be maintained normally even in rats fed with the MCFA-rich diet. Adipose tissue-derived adipocytokines are well-known as mediators of both metabolic function and metabolic dysfunction<sup>28, 29</sup>). Adiponectin and leptin are target agents for diabetes research because of their anti-diabetic effects; they are expected to become novel therapeutic tools for treating metabolic disorders<sup>28, 29</sup>). A decrease in the circulating adiponectin levels was reported to be associated with the development of diabetes and metabolic syndrome<sup>28</sup>). Leptin also plays a key role in the regulation of energy intake and energy expenditure, and its circulating levels are positively related to adiposity<sup>30</sup>). Our data show that the plasma adiponectin concentration was significantly higher in the MCFA and SC groups than in the LCFA group. In contrast, the plasma leptin concentration was significantly lower in the MCFA and SC groups than in the LCFA group. Taken together, these results suggest that dietary MCFAs could be instrumental in the prevention of obesity, and, consequently, may attenuate the risk of developing diabetes and metabolic syndrome via alteration in the levels of circulating adipocytokines.

## 5 CONCLUSIONS

This study shows that the MCFA- and LCFA-based high-fat diets have diverse effects on fat accumulation. We found that the MCFA-based high-fat diet enhances the activity of the mitochondrial oxidative enzyme CS in both fast- and slow-twitch skeletal muscles. This study is the first to demonstrate this effect in skeletal muscles. H-FABP concentration is increased by the intake of LCFA but not MCFA, suggesting that the metabolic fate of FAs is dependent on their chain length in the cytoplasm of skeletal muscle cells.

## Acknowledgments

This research was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports, and Culture (18500624, AN).

## References

- 1) Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Lehmann, J. M.; Wisely, G. B.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A.; Milburn, M. V. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* **3**, 397-403 (1999).
- 2) Luquet, S.; Lopez-Soriano, J.; Holst, D.; Fredenrich, A.; Melki, J.; Rassoulzadegan, M.; Grimaldi, P. A. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J.* **17**, 2299-2301 (2003).
- 3) Chmurzyńska, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* **47**, 39-48 (2006).
- 4) Bass, N. M. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int. Rev. Cytol.* **111**, 143-184 (1988).
- 5) Clavel, S.; Farout, L.; Briand, M.; Briand, Y.; Jouanel, P. Effect of endurance training and/or fish oil supplemented diet on cytoplasmic fatty acid binding protein in rat skeletal muscles and heart. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**, 193-201 (2002).
- 6) Chang, W.; Rickers-Haunerland, J.; Haunerland, N. H. Induction of cardiac FABP gene expression by long chain fatty acids in cultured rat muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **221**, 127-132 (2001).
- 7) Van Breda, E.; Keizer, H. A.; Vork, M. M.; Surtel, D. A.; de Jong, Y. F.; van der Vusse, G. J.; Glatz, J. F. Modulation of fatty-acid-binding protein content of rat heart and skeletal muscle by endurance training and testosterone treatment. *Pflügers Arch.* **421**, 274-279 (1992).
- 8) Holloszy, J. O.; Booth, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **38**, 273-291 (1976).
- 9) Reichmann, H.; Hoppeler, H.; Mathieu-Costello, O.; Von Bergen, F.; Pette, D. Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflügers Arch.* **404**, 1-9 (1985).
- 10) Miller, W. C.; Bryce, G. R.; Conlee, R. K. Adaptations to a high fat diet which increase exercise endurance in male rats. *J. Appl. Physiol. Respir. Env. Exerc. Physiol.* **26**, 78-83 (1983).
- 11) Hancock, C. R.; Han, D. H.; Chen, M.; Terada, S.; Yasuda, T.; Wright, D. C.; Holloszy, J. O. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7815-7820 (2008).
- 12) Han, D. H.; Hansen, P. A.; Host, H. H.; Holloszy, J. O. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes* **46**, 1761-1767 (1997).
- 13) Papamandjaris, A. A.; MacDougall, D. E.; Jones, P. J. H. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.* **62**, 1203-1215 (1998).
- 14) St-Onge, M. P.; Bosarge, A. Weight-loss diet that includes consumption of medium-chain triacylglycerol oil leads to a greater rate of weight and fat mass loss than does olive oil. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 621-626 (2008).
- 15) Bach, A. C.; Babayan, V. K. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* **36**, 950-962 (1982).
- 16) Shinohara, H.; Ogawa, A.; Kasai, M.; Aoyama, T. Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium-and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1811-1818 (2005).
- 17) Turner, N.; Hariharan, K.; TidAng, J.; Frangioudakis, G.; Beale, S. M.; Wright, L. E.; Zeng, X. Y.; Leslie, S. J.; Li, J. Y.; Kraegen, E. W.; Cooney, G. J.; Ye, J. M. Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. *Diabetes* **58**, 2547-2554 (2009).
- 18) Ariano, M. A.; Edgerton, V. R.; Armstrong, R. B. Hindlimb Muscle Fiber Populations of Five Mammals. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 51-55 (1973).
- 19) Armstrong, R. B.; Phelps, R. O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* **171**, 259-272 (1984).
- 20) Collatos, T. C.; Edgerton, V. R.; Smith, J. L.; Botterman, B. R. Contractile properties and fiber type compositions of flexors and extensors of elbow joint in cat: implications for motor control. *Neurophysiology* **49**,

- 1292-1300 (1977).
- 21) Srere, P. A. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* **13**, 3-11 (1969).
- 22) Pette, D.; Staron, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 359-372 (2001).
- 23) Garcia-Roves, P.; Huss, J. M.; Han, D. H.; Hancock, C. R.; Iglesias-Gutierrez, E.; Chen, M.; Holloszy, J. O. Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 10709-10713 (2007).
- 24) Veerkamp, J. H.; van Moerkerk, H. T. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol. Cell. Biochem.* **123**, 101-106 (1993).
- 25) Poirier, H.; Braissant, O.; Niot, I.; Wahli, W.; Besnard, P. 9-cis-Retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene. *FEBS Lett.* **412**, 480-484 (1997).
- 26) Bach, A. C.; Ingenbleek, Y.; Frey, A. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J. Lipid Res.* **37**, 708-726 (1996).
- 27) Han, J. R.; Deng, B.; Sun, J.; Chen, C. G.; Corkey, B. E.; Kirkland, J. L.; Ma, J.; Guo, W. Effects of dietary medium-chain triglyceride on weight loss and insulin sensitivity in a group of moderately overweight free-living type 2 diabetic Chinese subjects. *Metabolism* **56**, 985-991 (2007).
- 28) Kadowaki, T.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Hara, K.; Ueki, K.; Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 1784-1792 (2006).
- 29) Rabe, K.; Lehrke, M.; Parhofer, K. G.; Broedl, U. C. Adipokines and insulin resistance. *Mol. Med.* **14**, 741-751 (2008).
- 30) Chilliard, Y.; Bonnet, M.; Delavaud, C.; Faulconnier, Y.; Leroux, C.; Djiane, J.; Bocquier, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest. Anim. Endocrinol.* **21**, 271-295 (2001).
-

## 脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構

石澤 里枝<sup>1)</sup> 山田 達也<sup>1,2)</sup> Hamidie, D. R. Ronald<sup>1)</sup> 増田 和実<sup>3)</sup>The mechanism of mitochondrial biogenesis  
by fatty acid in skeletal musclesRie ISHIZAWA<sup>1)</sup> Tatsuya YAMADA<sup>1,2)</sup>  
Ronald D. R. HAMIDIE<sup>1)</sup> Kazumi MASUDA<sup>3)</sup>

## Abstract

Lipids and long-chain fatty acids (LCFAs) are energy-rich compounds that play an important role in fatty acid (FA) metabolism. Over the past decade, it has become evident that LCFAs act as signaling molecules regulating gene expression, and that their target genes encode proteins with some role in FA transport and metabolism. An important adaptation of muscle to endurance exercise is also its increased mitochondrial density and oxidative enzyme activity, the latter of which is associated with robust stimulation of mitochondrial biogenesis. Under the conditions of high-fat nutrition (45%-60% of total calories are derived from fat), in which LCFAs are available in excess, mitochondrial proteins and FA oxidation (FAO)-related protein levels were increased in both type I and type II skeletal muscle fibers, suggesting that high-fat nutrition can enhance the capacity of mitochondrial FAO. In summary, these studies showed that LCFAs are capable of increasing synthesis of FA metabolism-related proteins. Feeding a LCFA-based diet was found to induce an increase in mitochondrial biogenesis in muscles by activating the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) family of nuclear transcription factors. Long-chain both saturated and unsaturated FA (C16-C20) are natural PPARs ligands. Although LCFA-based high-fat diets, which contain saturated LCFAs, led to obesity and insulin resistance, some studies suggested that medium-

1) 金沢大学大学院自然科学研究科

2) 日本学術振興会特別研究員

3) 金沢大学人間社会研究域人間科学系

連絡先 増田和実

金沢大学人間社会研究域人間科学系

〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: masudak@staff.kanazawa-u.ac.jp

電話: 076-264-5568, Fax: 076-234-4100

1) Graduate School of Natural Science and  
Technology, Kanazawa University, Kanazawa,  
Japan2) Research Fellow of the Japan Society for the  
Promotion of Science, Japan3) Faculty of Human Science, Kanazawa University,  
Kanazawa, Japan

Kazumi MASUDA, Ph.D., Professor

Faculty of Human Sciences, Kanazawa University,  
Kakuma-machi, Kanazawa-city, Ishikawa 920-1192,  
Japan

E-mail: masudak@staff.kanazawa-u.ac.jp

Phone: 076-264-5568, Fax: 076-234-4100



chain FAs (MCFAs), composed of a chain of 8-12 carbon atoms, have anti-obesity potential. Compared with LCFAs, MCFAs have several unique nutritional and physiological properties. However, the effect of MCFAs diet-fed on mitochondrial protein levels in skeletal muscle remains unclear. The recent study demonstrated that MCFA-rich diets also increase mitochondrial protein levels in skeletal muscle, suggesting that MCFAs can enhance muscle mitochondrial oxidative capacity. We will, therefore, review and summarize that the metabolic fate of FAs is dependent on their chain length in the cytoplasm of skeletal muscle cells.

**Key words: fatty acid, medium-chain fatty acid, mitochondrial biogenesis, skeletal muscle, PPAR**

## はじめに

1871年にドイツの医学者 Hoffmann によって、医学の一分野として栄養学が日本へ初めて伝えられた。その後、医学博士である佐伯矩は世界初となる栄養研究機関を日本において開設して、栄養学を医学から独立・体系化した。後に彼は世界的な「栄養学の創始者」と呼ばれるようになった。21世紀に入り、分子生物学分野の急速な進歩によってヒトの全ゲノムが解明された。それ以来、食と身体の間わりも組織や細胞レベルにとどまらず、遺伝子や分子レベルで明らかになりつつある。この背景には、栄養素が遺伝子にどのような影響を与えるか（ニュートリゲノミクス）、または個々の遺伝的な体質に対して栄養素をどのように補完していくか（ニュートリジェネティクス）を調べる研究手法が発展してきたことが挙げられる。このような研究手法が用いられてきたことによって、栄養素の新規機能が遺伝子レベルで次々と発見されてきている。

Miller et al. (1983) は脂質食の摂取は骨格筋のミトコンドリアを増加させて運動パフォーマンスを向上させるということを報告した。これは運動と同じような骨格筋の適応が脂質の摂取によってもたらされることを意味している。脂質が骨格筋のミトコンドリアを増加させるという現象は栄養学に留まらず、運動生理学の分野においても脂質の新規機能として注目されている。しかしながら、脂質食の摂取は体脂肪の蓄積やインスリン抵抗性をも誘発させる (Han et al., 1997)。そのため、

脂質食による運動パフォーマンスの向上効果に対して十分な知識とその根拠を精査しなかったが故に、身体へ悪影響を及ぼしてしまう可能性も一方では秘めている。このような自体を招かない為にも情報の送り手から発信される情報の背後にある「エビデンス」を理解して、情報の受け手が正しく精査することが非常に重要である。本稿では、運動パフォーマンスの向上に必要なミトコンドリア生合成に対する脂質食の果たす役割について、その分子基盤を概説しながら、最近の知見を紹介する。

## 1. 脂肪酸

脂質は細胞膜の主要な構成因子として生命を包み、外界との境界を定めている重要な物質である。過去十数年間の研究の発展によって、脂質が単に膜の構成成分ではなく、脂質は固有の役割をもっていることが明らかにされつつある。脂質の機能とは、第一にタンパク質および糖質と並ぶ三大栄養素の一つであり、エネルギー源として利用されること、第二に細胞膜における主な構成成分として機能すること、そして近年、脂質がシグナル分子として遺伝子発現を誘導することが脂質の新たな第三機能として注目されている。生体内には様々な脂質分子が存在するが、その基本成分や前駆体としての役割を担っているのが脂肪酸である。脂肪酸はその構造の違いから多様性に富み、機能的にも非常に多彩である。脂質の多様性は含まれる脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度、極性基の種類およ

びリン酸化などの化学修飾の組み合わせによって生み出される。中性脂肪 (TG; triglyceride) はグリセロールと脂肪酸がエステル結合した構造を有する。脂肪酸は炭素鎖に二重結合あるいは三重結合を有さない飽和脂肪酸 (SFA; saturated fatty acid) と、それらの結合を有する不飽和脂肪酸 (UFA; unsaturated fatty acid) に分類される。さらに、UFAは二重結合を1つ有する一価不飽和脂肪酸 (MUFA; monounsaturated fatty acid) と二重結合を2つ以上有する多価不飽和脂肪酸 (PUFA; polyunsaturated fatty acid) に分類される。脂肪酸は炭素の鎖長によっても分類され、炭素数2~6個の脂肪酸を短鎖脂肪酸 (SCFA; short-chain fatty acid)、炭素数8~12個の脂肪酸をMCFA、さらに炭素数14個以上の脂肪酸をLCFAの3種類に分類される。LCFAは主として動物油脂に豊富に含まれている。一方で、MCFAは動物油脂にはほとんど含まれず、ココナッツ油脂 (5~10%)、牛乳や人乳 (3~5%) などに豊富に含まれている (Bach et al., 1996)。

## 2. 骨格筋における長鎖脂肪酸の代謝

脂質は主要なエネルギー源として骨格筋や心筋で利用される。血中のFFA (FFA; free fatty acid) はアルブミンと結合し、骨格筋をはじめとする各組織へ輸送される。血中から骨格筋へ取り込まれたLCFAは筋細胞膜に局在する脂肪酸トランスポーターであるFABPpm (plasma membrane fatty acid binding protein)、FAT/CD36 (fatty acid translocase/CD36) またはFATP (fatty acid transport protein) を介して筋細胞内へ取り込まれる (Abumrad et al., 1999)。LCFAは筋細胞質内においてFABPc (cytosolic fatty acid binding protein) と結合することによって細胞質内の移動を可能とし、ミトコンドリアへ輸送される (Abumrad et al., 1999)。その後、LCFAはミトコンドリア外膜にあるアシルCoAシンターゼによって長鎖アシルCoA (coenzyme A) へ変換される。長鎖アシルCoAはミトコンドリア内膜を通過できないため、CPT (carnitine palmitoyltransferase) 系を介してミトコンドリア膜を通過する

(Abumrad et al., 1999)。長鎖アシルCoAはミトコンドリア外膜に局在するCPTIによってアシルカルニチンへ変換され、アシルカルニチンはミトコンドリア外膜を通過した後、ミトコンドリア内膜に存在するCPTIIによって再びアシルCoAへ変換される。ミトコンドリア内へ取り込まれたアシルCoAは3-HADによって酸化され、アセチルCoAを産生する。その後アセチルCoAはTCA (tricarboxylic acid) 回路に入り、電子伝達系によって最終的に二酸化炭素と水を産生してATP (adenosine triphosphate) が再合成される (Doenst et al., 2013; Figure 1)。

## 3. 運動による骨格筋の代謝機能の適応

ミトコンドリアにおいてATPの再合成が行われることから、ミトコンドリアは生命維持活動や運動時に必要なエネルギーを産出する重要な細胞小器官である。Holloszy and Booth (1976) によって初めて持続的トレーニングは骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性を増加させることが報告された。この発見以来、運動による骨格筋の重要な適応の一つにミトコンドリアの増加が生じることはコンセンサスが得られている。持続的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリア生合成の生理学的な意義は「筋グリコーゲン利用を節約すること」である (Holloszy and Booth, 1976)。75%  $\dot{V}O_{2\max}$  (maximal oxygen consumption) のような中程度強度の持続的運動では筋グリコーゲンが枯渇すると疲労困憊となるため (Pernow and Saltin, 1971)、筋グリコーゲンの利用を節約して枯渇させないことが運動パフォーマンスの維持・向上に重要である。持続的トレーニングによる骨格筋のミトコンドリアの増加や $\beta$ 酸化に関わるミトコンドリア関連酵素活性の増大によって、運動時の脂質利用が亢進する (Holloszy et al., 1996)。持続的トレーニングによる骨格筋におけるミトコンドリアの増加は脂質酸化能を向上させて、筋グリコーゲンの利用を節約することを可能とする。実際にミトコンドリアの増加による骨格筋代謝の適応を検証した結果、トレーニング前と比較してトレーニング後においてATP合成速度が増大し

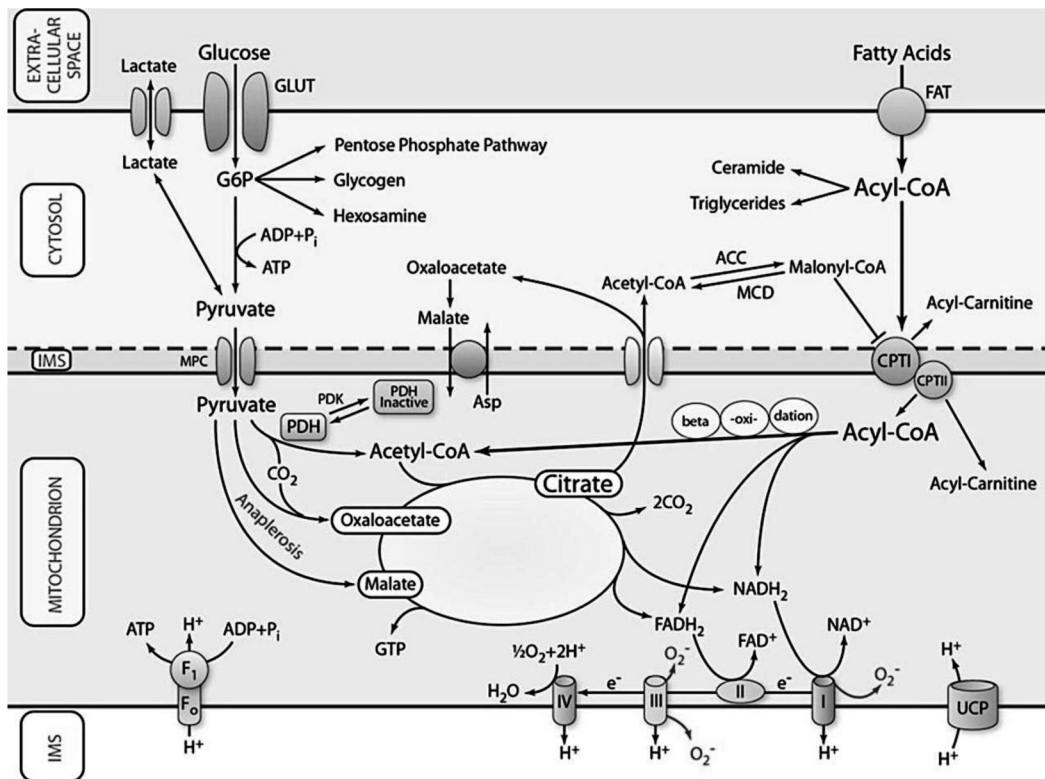


Figure 1. Schematic representation of classic pathways of cardiac metabolism (Doenst et al., 2013).

グルコースや脂質は様々な代謝経路を経て、細胞質からミトコンドリアへ輸送され、ミトコンドリア内においてATPを再合成する。ACC, acetyl-CoA carboxylase; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; ASP, aspartic acid; CPT, carnitine palmitoyltransferase; GTP, guanosine triphosphate; FAT, fatty acid transporter; G6P, glucose 6-phosphate; GLUT, glucose transporter; IMS, mitochondrial intermembrane space; MCD, malonyl-CoA decarboxylase; MPC, mitochondrial pyruvate carrier; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; UCP, uncoupling protein.

て運動パフォーマンスを向上させた (Wibom et al., 1992)。

近年、運動生理学の分野にも分子生物学的手法の導入が進み、運動による骨格筋ミトコンドリア生合成のメカニズムは遺伝子レベルで明らかになりつつある。ミトコンドリア生合成の機序に関してはこれまで多くの研究が報告されており、ミトコンドリア生合成において重要な役割を担っているタンパク質として、PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$ ), NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) や PPAR $\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptors) といった転写因子や転写補助因子が同定されている。骨格筋細胞に PGC-1 $\alpha$  遺伝子を導入して過剰

発現させたところ、ミトコンドリア関連遺伝子、mtDNA (mitochondrial DNA) コピー数の検出や電子顕微鏡観察によってミトコンドリア生合成が亢進したことが示された (Xu et al., 1999, Figure 2; Puigserver et al., 1998)。PGC-1 $\alpha$  は転写因子や核内受容体のコアクチベーターとして結合することによって転写を活性化することから、ミトコンドリア生合成に対して中核的な役割を担っている。PGC-1 $\alpha$  と結合する転写因子 NRF-1 (Murakami et al., 1998) や核内受容体 PPAR $\delta$  (Luquet et al., 2003) も持続的トレーニングによって増加する。PGC-1 $\alpha$  は NRF-1 を増加させ、NRF-1 と結合することによって転写活性を亢進させる。さらに NRF-1 は Tfam (mitochondrial



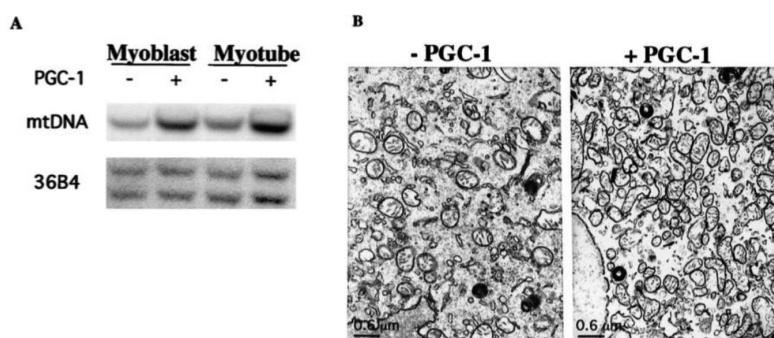


Figure 2. PGC-1 stimulates mitochondrial DNA replication and biogenesis (Xu et al., 1999).

(A) C2C12細胞においてPGC-1遺伝子の導入によってPGC-1を強制的に発現させたところ、筋芽細胞(myoblast)および筋肉細胞(myotube)ともにmtDNA量が増加した。(B) 電子顕微鏡観察によってPGC-1遺伝子を導入した筋細胞(+ PGC-1)においてコントロール(- PGC-1)と比較して57%のミトコンドリア密度の増加が確認された。The magnification is 8750 $\times$ . PGC-1, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator-1.

transcription factor A) の発現量を増加させ、mtDNA にコードされている遺伝子の転写を増大させる。Wang et al. (2003) は、骨格筋特異的にPPAR $\delta$  を過剰発現させたマウスにおいてミトコンドリア関連タンパク質や mRNA が増加するだけでなく、骨格筋の遅筋化が生じたことを報告し

ている (Figure 3)。これらの先行研究より、PGC-1 $\alpha$  は NRF-1 および Tfam 遺伝子の発現を誘導して、さらに NRF-1 や PPAR $\delta$  と複合体を形成して転写を活性化することによって包括的にミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御していることが明らかとなっている。

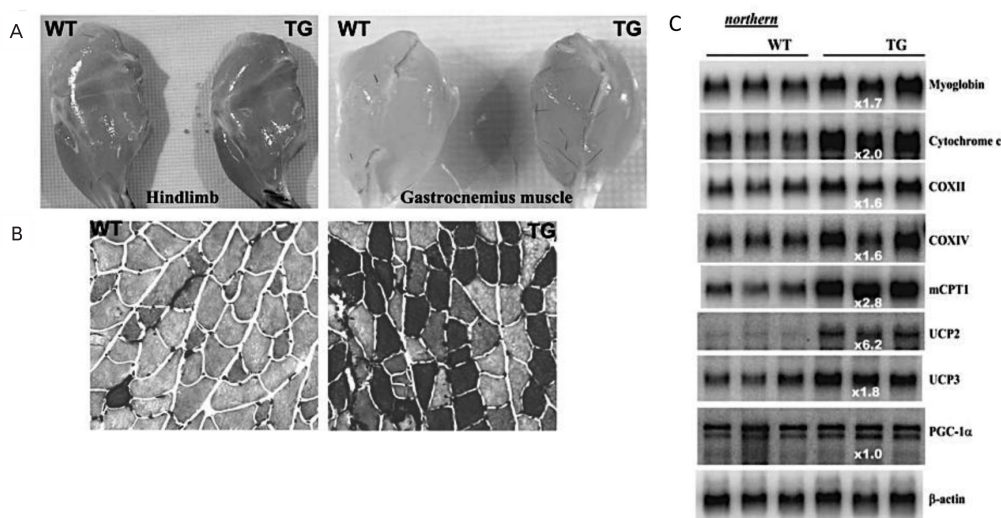


Figure 3. Increased oxidative type I fibers and mitochondrial biogenesis in the PPAR $\delta$  transgenic mice (Wang et al., 2003).

(A) PPAR $\delta$ トランスジェニック (TG) マウスの骨格筋において野生型 (WT) マウスと比較して遅筋化が生じた。(B) 足底筋においてミオシン ATPase 染色を行ったところ、PPAR $\delta$  TG マウスにおいて遅筋化が確認された。(C) 腓腹筋においてミトコンドリア関連のmRNAがWTと比較して PPAR $\delta$  TG マウスにおいて有意に増加した。COX, cytochrome c oxidase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator; UCP, uncoupling protein; TG, transgenic; WT, wild-type.

#### 4. 脂質食によるミトコンドリア生合成

骨格筋ミトコンドリア生合成の適応はトレーニングだけでなく、脂質摂取によっても生じることがいくつかの研究によって支持されている (Hancock et al., 2008, Figure 4; Han et al., 1997; Miller et al., 1983)。Miller et al. (1984) は5週間の高脂肪食は普通食と比較して骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性を上昇させ、疲労困憊に至るまでの運動時間を延長させたことを報告した。さらに、5週間の脂質食摂取が普通食と比較して骨格筋の脂肪酸酸化量やADP存在下 (State 3) のミトコンドリアの酸素消費速度を増加させて、ミトコンドリア呼吸能を亢進させる (Turner et al., 2007)。したがって、運動と同じように (前項3) 脂質食によるミトコンドリア量および機能の増加に伴って脂肪酸酸化が高まり、筋グリコーゲンの利用が節約されることによって運動パフォーマンスを亢進させる。

Simi et al. (1991) は持久的トレーニングと脂質食摂取を組み合わせで行った結果、骨格筋のミトコンドリア関連酵素活性が普通食摂取のみと比較して加算的に亢進することを報告した。運動模倣作用を有するAICAR (AICA riboside) と脂質食を6週間にわたり摂取させた結果、骨格筋におけるPGC-1 $\alpha$  および cytochrome c の発現量が加算

的に増加した (Fillmore et al., 2010)。これらの知見は運動トレーニングを行いながら脂質食を摂取することによって骨格筋のミトコンドリアに対するトレーニング効果をより高めることを示している。しかしながら、運動と脂質食による異なるPGC-1 $\alpha$  の発現機序に関して詳細は明らかにされていない。

脂質食は骨格筋のミトコンドリアの量や機能を亢進させる一方で、長期間にわたる脂質食摂取は体脂肪や体重の蓄積、インスリン抵抗性をも誘発させる (Han et al., 1997)。長期間にわたる脂質食摂取は骨格筋のミトコンドリアの量や機能を低下させるという知見も報告されている (Gerhart-Hines et al., 2007)。さらに、脂質食摂取によってパフォーマンスは向上するものの、吐き気や嘔吐など体調不良を訴える場合もあることから、脂質食はアスリートにとって必ずしも望ましい栄養摂取方法であるとはいえない。したがって、脂質食摂取によって運動パフォーマンス向上の効果を得るためには、脂質食摂取の適切な手法を検証して最適な摂取期間や摂取量を確立する必要がある。

#### 5. 核内受容体 PPARs による遺伝子発現

脂質食摂取によって骨格筋のミトコンドリアが増加することを述べてきたが、遺伝子レベルにお

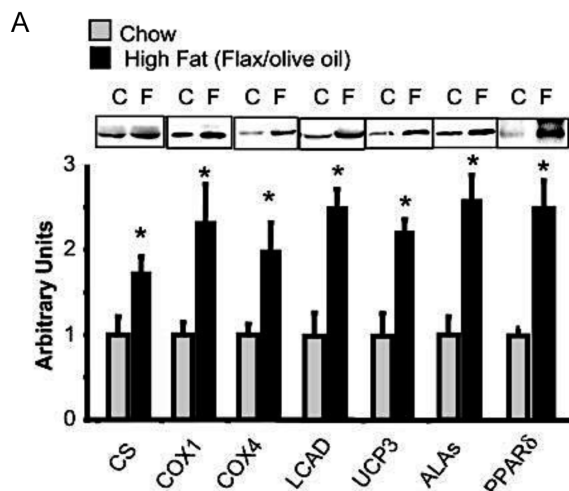


Figure 4. A high-fat diet induces an increase in skeletal muscle mitochondria (Hancock et al., 2008).

高脂肪食摂取は骨格筋におけるミトコンドリア関連タンパク質を有意に増加させた。Values are mean  $\pm$  SE for 6-10 muscles. \*:  $p < 0.05$ , high fat versus chow. C, control; F, high fat.

いてどのようなメカニズムによって脂質食は骨格筋のミトコンドリアを増加させているのだろうか？

脂質によって活性化される転写因子として PPARs が注目されている (Xu et al., 1999)。近年、核内レセプター研究の著しい発展によって、リガンド未同定の核内レセプターが多数発見され、その中でも PPARs は飛躍的に研究が進んだ核内レセプターの一つである。核内レセプターは栄養素やビタミン等の低分子リガンドと相互作用することで転写活性が制御されている。核内レセプターは低分子リガンドと結合するレセプターとしての機能と、転写因子としての機能の二つの性質を持っている。核内受容体研究はこれまで転写因子の分子生物学における中心的な研究課題であった。PPARs には PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$  ( $\beta$ ) および PPAR $\gamma$  の 3 つのアイソフォームが同定されている。PPAR $\alpha$  は肝臓や腎臓、骨格筋、心筋、副腎等の各組織に発現している (Rakhshandehroo et al., 2010)。PPAR $\gamma$  は主に脂肪組織やマクロファージおよび血管平滑筋に (Tai et al., 1996)、PPAR $\delta$  は全身にわたり発現している (Evans et al., 2004)。

Issemann et al. (1990) によって PPARs は抗高脂血症薬のクロフィブレートによって活性化されることが初めて報告された。さらに、 $\alpha$  リノール酸、 $\gamma$  リノール酸、エイコサペンタン酸 (EPA; eicosapentaenoic acid) やアラキドン酸などの PUFA、オレイン酸やパルミチン酸といった SFA や UFA、 $\omega$ -3 脂肪酸が PPARs のリガンドとして作用する (Zhou et al., 2012, Figure 5)。Xu et al. (1999) は PPARs に対する各脂肪酸の結合をシンチレーションプロキシミティアッセイ法 (SPA; scintillation proximity assay) によって検証した結果、SFA (パルミチン酸, IC<sub>50</sub>: 7.4  $\mu$ M) よりも UFA ( $\gamma$  リノレン酸, IC<sub>50</sub>: 0.8  $\mu$ M) の方が PPAR $\alpha$  に対する結合親和性が高いことを示唆している。このように脂肪酸の不飽和度の違いによっても PPARs に対する結合親和性が異なる。

骨格筋では主に PPAR $\delta$  が、次いで PPAR $\alpha$  が多く発現しており、ミトコンドリア関連遺伝子や脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を制御している (Stephenson et al., 2012)。PPAR $\delta$  のアゴニスト

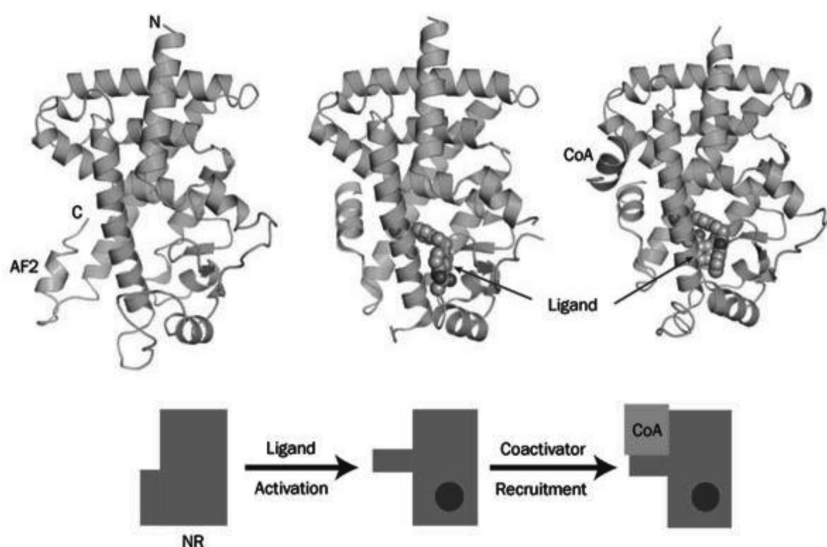


Figure 5. A comparison of the ligand-induced activation modes of nuclear receptors (modified from Zhou et al., 2012).

リガンド未結合状態では PPARs に対してコリプレッサーが会合して AF2 をブロックし、PPARs の転写促進を抑制している。一方、リガンドが PPARs の LBD に結合して PPAR/RXR の heterodimer 複合体が形成されると、コリプレッサーが解離してコアクチベーターが AF2 に結合し、転写誘導に必要な複合体形成を誘導して転写を開始する。AF, activation function; LBD, ligand binding domain; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid X receptor.

(GW501516) によって CPT1 や 3-HAD 等の  $\beta$  酸化関連遺伝子の発現量に伴う脂肪酸酸化量の増加やミトコンドリア関連タンパク質が増加することがラット骨格筋 (Tanaka et al., 2003) および骨格筋培養細胞 (Hondares et al., 2007) において認められている。さらに, PPAR $\delta$  を骨格筋特異的に過剰発現させた筋において遅筋化が生じ, さらに運動時間も延長した (Gan et al., 2013)。一方で, PPAR $\alpha$  を過剰発現させた骨格筋においては遅筋線維が減少して運動時間も短縮した (Gan et al., 2013)。これらの知見は, 骨格筋におけるミトコンドリア関連遺伝子発現や遅筋化に対して PPAR $\alpha$  ではなく PPAR $\delta$  が制御していることを示している。高脂肪食の摂取によって骨格筋の PPAR $\delta$  タンパク質が普通食と比較して増加することが分かっている (Hancock et al., 2007)。さらに脂質食摂取による FFA の上昇は CPT1 プロモーター上における PPAR $\delta$  の結合を増加させて PPAR $\delta$  による CPT1 遺伝子発現を誘導させる (Garcia-Roves et al., 2007)。したがって, 高脂肪食によって骨格筋内への脂肪酸取り込み量が増加し, 脂肪酸が PPARs のリガンドとして作用することによって PPAR $\delta$  の標的遺伝子であるミトコンドリアや脂肪酸酸化関連遺伝子の発現が誘導されるといった一連の経路を経てミトコンドリア合成が生じる。

## 6. 中鎖脂肪酸

長期間にわたる LCFA の摂取は体脂肪を蓄積させ, インスリン抵抗性を引き起こす (Han et al., 1997) 一方で, LCFA よりも炭素数の少ない MCFA は体脂肪を蓄積させない特性を有する (Bach and Babayan, 1982)。MCFA が体脂肪を蓄積させない理由として, LCFA と異なる消化吸收および代謝経路を経ることが挙げられる (Bach and Babayan, 1982)。1951年に Bloom et al. (1951) が放射線ラベルした各種脂肪酸をラットに投与した際, 炭素数12以下の MCFA が門脈中に存在することを発見したことが MCFA 研究の始まりである。その後, ヒトを対象として MCFA 摂取実験が行われ, MCFA の消化吸収に関する基礎

研究が行われた (Greenberger et al., 1966)。炭素数 8~12 の MCFA と炭素数14以上の LCFA の消化吸收経路は大きく異なっている (Bach et al., 1996, 1982; Greenberger et al., 1966)。中鎖トリアシルグリセロール (MCT; medium-chain triacylglycerol) は摂取後, 口腔内において舌リパーゼによって分解される。その分解量は LCT と比較すると非常に多いことが分かっている (Greenberger et al., 1966)。その後, 胃内へ輸送された MCT は胃リパーゼや胃酸によって加水分解されて, 大部分の MCT がグリセロールと3つの MCFA に分解される。したがって, 十二指腸に到達した際, MCT の殆どが MCFA の形として存在することから, 胰リパーゼによる分解を必要としない。また, MCFA は水溶性を示すことから, 胆汁酸ミセルを形成する必要がない。そのため, MCFA はグルコースやアミノ酸と同様に門脈を通過して肝臓へ運ばれる (Holt, 1967)。これは MCT が LCT のように十二指腸における TG の分解を必要としないことを示しており, MCT が胰リパーゼによる分解や脂質成分のキャリアである胆汁酸ミセルの形成を必要としないで小腸において吸収されることを意味している。LCFA よりも MCFA の小腸上皮細胞における吸収速度は速く, MCFA は糖質と同等の速度で吸収されることが分かっている (Bach and Babayan., 1982)。そのため, これまで消化吸収性の劣る術後患者や消化吸収機能障害患者の重要なエネルギー源として MCT は利用されてきた。

門脈を通過して肝臓に到達した MCFA は  $\beta$  酸化を受けてエネルギー源として利用され, 最終的には二酸化炭素と水に分解されるが (Bach et al., 1996), MCFA と LCFA とでは大きく異なった代謝経路を経る。MCFA は細胞内のミトコンドリアに移行する際にカルニチンを必要としない。LCFA がミトコンドリアマトリクスへ移行して酸化されるためには, ミトコンドリア外膜と内膜に局在する CPT と LCFA アシル CoA との結合を必要とする。しかしながら, MCFA はこれらの輸送系の結合を必要としないでミトコンドリアへ取り込まれる。そのため, MCFA は  $\beta$  酸化へ移行する



速度が LCFA に比べて速いことが分かっている (Metges and Wolfram, 1991)。MCFA は MCFA アシル CoA に代謝された後、ミトコンドリアマトリクスにおける  $\beta$  酸化によってアセチル CoA へ代謝される (Bach et al., 1996)。酸化されなかったアセチル CoA はケトン体へ変換されて血中へ運ばれ、骨格筋や心臓、脳へ取り込まれる (Bach et al., 1996; Pi-Sunyer et al., 1969)。アセチル CoA へ変換されなかった一部の MCFA は骨格筋および脂肪組織等へ MCFA として取り込まれてエネルギー源として利用される (Bach et al., 1996)。

### 7. 中鎖脂肪酸の熱産生効果

MCFA は LCFA と比較して酸素消費量および二酸化炭素排泄量から算出される食事誘発性体熱産生 (DIT; diet-induced thermogenesis) が高いことが分かっている (Noguchi and Takeuchi, 2002)。ヒトに MCT 5 g または 10 g をそれぞれ単回摂取させたところ、食後 6 時間までの DIT 総和値が LCT 摂取時よりも MCT 摂取時において有意に上昇した (Kasai et al., 2002)。このように MCFA と LCFA の DIT の違いが生じる理由に摂取後の消化、吸収、輸送および貯蔵によるエネルギー消費が MCFA と LCFA と異なることが挙げられる (Noguchi and Takeuchi, 2002)。LCFA はリンパ管を経て末梢組織へ輸送して、必要に応じて LPL (lipoprotein lipase) により脂肪酸に分解される。その後、脂肪組織等に貯蔵されるため LCFA による熱産生は極めて少ない。一方で、MCFA は MCFA アシル CoA からアセチル CoA へ  $\beta$  酸化される過程に続き、二酸化炭素またはケトン体さらに *denovo* 合成脂肪へ酸化、分解および変換される割合が高いため、MCFA の代謝エネルギー量は LCFA に比べて高いことが分かっている (Seaton et al., 1986)。

### 8. 中鎖脂肪酸の体脂肪抑制効果

MCFA は LCFA と比較すると体脂肪を蓄積させにくいことが報告されている (Malapaka et al., 2012; Noguchi and Takeuchi, 2002; Papamandjaris et al., 1998)。Tsuji et al. (2001)

は健常者を対象として、12週間にわたり MCFA を 9.2 g (MCT: 10 g) 摂取させたところ、コントロールの植物油摂取群よりも MCFA 摂取群において体脂肪蓄積の抑制効果を有することを確認した。摂取後のエネルギー消費量は LCT よりも MCT において高いため、MCT は LCT よりもエネルギー源として利用されやすい。このことが MCT による体脂肪蓄積の抑制要因として考えられている (Noguchi and Takeuchi, 2002; Seaton et al., 1986)。最近の知見によって、3T3-L1 脂肪細胞におけるオクタン酸 (炭素数 8 の MCFA) 添加によって LCFA であるオレイン酸よりも脂質生成が抑制されたことが示唆された (Malapaka et al., 2012)。さらに彼らは、オクタン酸添加によって 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪生成に関わる遺伝子である CEBP (CCAAT/enhancer binding protein) の発現量がオレイン酸添加よりも低かったことを示している (Malapaka et al., 2012)。

これらの知見から、MCFA が LCFA よりも体脂肪を蓄積させにくい理由として、生体内において MCFA のエネルギー消費量が高いだけでなく、脂肪細胞における脂肪生成関連遺伝子の発現抑制に MCFA が作用していることも挙げられる。しかしながら、MCFA による脂肪細胞における脂肪生成関連遺伝子の発現機序に関しては未だ不明な点も残されており、どのような機序で MCFA が脂肪生成関連遺伝子を制御しているのかについては今後、詳細な検証を必要とする。

### 9. 中鎖脂肪酸によるミトコンドリア生合成

前述したように長期にわたる LCFA 脂質食の摂取は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる一方で、体脂肪の蓄積やインスリン抵抗性を誘発するため (Han et al., 1997)、生理学的に必ずしも有効な栄養摂取方法とはいえない。MCFA と LCFA の消化吸收経路は大きく異なっているが (Bach et al., 1996, 1982; Greenberger et al., 1966)、MCFA と LCFA は共に骨格筋のエネルギー源として利用される (Bach et al., 1996)。しかしながら、MCFA に関する研究は LCFA と比較すると非常に少なく、MCFA が骨格筋ミトコンドリ

ア合成を誘発させる分子として作用するのかについては明らかとなっていない。そこで著者らは MCFA 脂質食によるラット骨格筋のミトコンドリア合成を検証した結果、遅筋線維および速筋線維共に MCFA 脂質食はクエン酸合成酵素活性を亢進させ、ミトコンドリア合成を誘発させることを示唆した (Ishizawa et al., 2014; Figure 6)。さらに、MCFA 脂質食は LCFA 脂質食よりも  $\beta$  酸化を亢進させる可能性も示された。これらの結果から、MCFA は LCFA と同様に骨格筋のミトコンドリア合成を誘発させるシグナル分子として作用することを示唆した。

次ぎに著者らは MCFA 脂質食による骨格筋のミトコンドリア合成はどのようなメカニズムによって生じているのかという疑問の解明に取り組んだ。PPARs と LCFA や UFA との結合の有無に関しては確認されているが (Xu et al., 1999), MCFA をターゲットとして PPARs との相互作用を評価した研究は非常に少ない。そこで TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 法を用いて MCFA と PPARs との結合の有無を検証した結果、LCFA と比較して MCFA における PPARs に対する結合親和性は非常に低かった (Ishizawa et al., 未発表資料)。この結果は LCFA とは異なり、MCFA による骨格筋ミトコンドリア合成に対して PPARs は関

与しない可能性を示唆している。したがって、MCFA は LCFA と同様に遺伝子発現を制御するシグナル分子として作用するが、ミトコンドリア遺伝子発現の様相は同一でも脂肪酸鎖長の違いによって遺伝子発現のシグナル経路に違いがもたられることが示唆された。しかしながら、MCFA による骨格筋ミトコンドリアの増加機序については未だ明らかとなっていない。

近年, Galmozzi et al. (2013) によって、HDAC (HDAC; histone deacetylase) 阻害剤は C2C12 細胞において PGC-1 $\alpha$  のプロモーター上のヒストンアセチル化を増加させて PGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現を誘導し、ミトコンドリアタンパク質を増加させることが明らかとなった。ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を「ON」にする。短鎖脂肪酸である酪酸は HDAC の阻害剤として作用して、ヒストンのアセチル化を増加させることが分かっている (Candido et al., 1978)。酪酸によるヒストンのアセチル化が骨格筋のミトコンドリアを増加させるという知見は未だ報告されていないが、これらの知見から MCFA による骨格筋のミトコンドリア合成はヒストンのアセチル化が関与しているという仮説が浮かび上がってくる。今後、MCFA によるミトコンドリア合成機序に関してエピジェネティックによる遺伝子発現の視点から検証することによって、脂肪酸の機能として新た

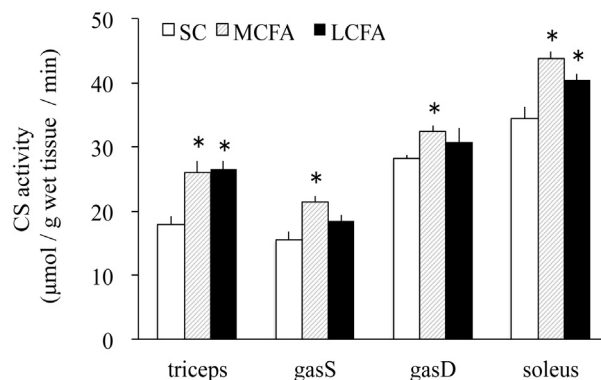


Figure 6. Citrate synthase (CS) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets (Ishizawa et al., 2014).

MCFA脂質食は普通食と比較して骨格筋のCS活性を有意に上昇させた。Data represent mean  $\pm$  SE (n = 5-7). \*: p < 0.05 vs. SC group. gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; MCFA, medium-chain fatty acid; LCFA, long-chain fatty acid; SC, standard chow.

な見解を与えるものになることが期待できる。

## おわりに

脂質がシグナル分子として遺伝子発現を誘導することが新たな脂質の第三機能として注目されている。本稿ではミトコンドリア生合成を誘発して骨格筋代謝を向上させる分子としての脂質とその機序について紹介した。近年では運動による骨格筋ミトコンドリア生合成の機序に関して転写レベルで研究が進み、その機序は明らかになりつつある。脂肪酸という栄養素が運動と同じように骨格筋のミトコンドリアを増加させるという現象は、運動栄養学の分野において脂肪酸の新しい機能として注目されてきた。しかしながら、その機序や脂肪酸の違いによる作用相違点に関しては明らかにされていない点が多い。脂肪酸の違いによるミトコンドリア生合成機序について解明するためには、栄養学に留まらず運動生理学、遺伝学、薬学や分子生物学等の多岐にわたる分野の連帯が必要になるだろう。栄養さらには生命現象に至るまでの遺伝子の働きや作用機序の解明は、健康維持・増進に必要な統合的かつ機能的な概念であり、それらを解明することによって新しい栄養学の姿が見えてくると考えられる。

## Acknowledgement

本稿で紹介した研究結果の一部は、文部科学省科学研究費補助金 (26282183 研究代表：増田和実)、(公財) 日本科学協会笹川科学研究助成および(公財) ヤマハ発動機スポーツ振興財団スポーツチャレンジ研究助成(研究代表：石澤里枝)の支援を受けて実施された。

## References

Abumrad, N., Coburn, C. and Ibrahimi, A. (1999) Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 4-13.

Bach, A. C. and Babayan, V. K. (1982) Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin.*

*Nutr.* 36: 950-962.

Bach, A. C., Ingenbleek, Y. and Frey, A. (1996) The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J. Lipid Res.* 37: 708-726.

Bloom, B., Chaikoff, I. L., Reinhardt, W. O. and Dauben, W. (1951) Participation of phospholipides in lymphatic transport of absorbed fatty acids. *J. Biol. Chem.* 189: 261-267.

Brand, M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 897-904.

Candido, E. P. M. and Davie, J. R. (1978) Sodium butyrate cultured cells inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14: 105-113.

Doenst, T., Nguyen, T. D. and Abel, E. D. (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 113: 709-724.

Evans, R. M., Barish, G. D. and Wang, Y. X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10: 355-361.

Fillmore, N., Jacobs, D. L., Mills, D. B., Winder, W. W. and Hancock, C. R. (2010) Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 109: 511-520.

Galmozzi, A., Mitro, N., Ferrari, A., Gers, E., Gilardi, F., Godio, C. and Crestani, M. (2013) Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* 62: 732-742.

Gan, Z., Rumsey, J., Hazen, B. C., Lai, L., Leone, T. C., Vega, R. B. and Kelly, D. P. (2013) Nuclear receptor/microRNA circuitry links

- muscle fiber type to energy metabolism. *J. Clin. Invest.* 123: 2564-2575.
- Garcia-Roves, P., Huss, J. M., Han, D. H., Hancock, C. R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M. and Holloszy, J. O. (2007) Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 10709-10713.
- Greenberger, N. J., Rodgers, J. B. and Isselbacher, K. J. (1966) Absorption of medium and long chain triglycerides: factors influencing their hydrolysis and transport. *J. Clin. Invest.* 45: 217-227.
- Hancock, C. R., Han, D. H., Chen, M., Terada, S., Yasuda, T., Wright, D. C. and Holloszy, J. O. (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7815-7820.
- Han, D. H., Hansen, P. A., Host, H. H. and Holloszy, J. O. (1997) Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes* 46: 1761-1767.
- Holloszy, J. O. and Booth, F. W. (1976) Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38: 273-291.
- Holloszy, J. O. and Kohrt, W. M. (1996) Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 121-138.
- Holt, P. R. (1967) Medium chain triglycerides. A useful adjunct in nutritional therapy. *Gastroenterology* 53: 961-966.
- Hondares, E., Pineda-Torra, I., Iglesias, R., Staels, B., Villarroya, F. and Giralt, M. (2007) PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 1021-1027.
- Ishizawa, R., Masuda, K., Sakata, S. and Nakatani, A. (2015) Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. *J. Oleo Sci.* accepted for publication.
- Isseimann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Cell* 18: 645-650.
- Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Takeuchi, H., Aoyama, T., Ohra, A., Harada, Y., Okazaki, M. and Kondo, K. (2002) Comparison of diet-induced thermogenesis of foods containing medium- versus long-chain triacylglycerols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 536-540.
- Luquet, S., Lopez-soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M. and Grimaldi, P. A. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  controls muscle development and oxydative capability. *FASEB J.* 17: 2299-2301.
- Malapaka, R. R., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J. H., Zhou, X. E., Xu, Y. and Xu, H. E. (2012) Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.* 287: 183-195.
- Martins, A. R., Nachbar, R. T., Gorjao, R., Vinolo, M. A., Festuccia, W. T., Lambertucci, R. H. and Hirabara, S. M. (2012) Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11: 30.
- Metges, C. C. and Wolfram, G. (1991) Medium- and long-chain triglycerides labeled with  $^{13}\text{C}$ : a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J. Nutr.* 121: 31-36.
- Miller, W. C., Bryce, G. R. and Conlee, R. K. (1983) Adaptations to a high fat diet which



- increase exercise endurance in male rats. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 26: 78-83.
- Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M. and Fujitsuka, N. (1998) Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 113-122.
- Noguchi, O. and Takeuchi, H. (2002) Larger thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 524-529.
- Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E. and Jones, P. J. H. (1998) Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.* 62: 1203-1215.
- Pernow, B. and Saltin, B. (1971) Muscle metabolism during exercise. Plenum Press pp. 289-299.
- Pi-Sunyer, F. X., Hashim, S. and Itallie, T. B. V. (1969) Insulin and ketone responses to ingestion of medium and long-chain triglycerides in man. *Diabetes* 18: 96-100.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., M?ller, M. and Kersten, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010: 20.
- Seaton, B., Welle, S., Wardenko, M. and Campbell, R. (1986) Thermic effect of medium-chain triglycerides in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 630-634.
- Simi, B., Sempore, B., Mayet, M. H. and Favier, R. J. (1991) Additive effects of training and high-fat diet on energy metabolism during exercise. *J. Appl. Physiol.* 71: 197-203.
- Stephenson, E. J., Camera, D. M., Jenkins, T., Kosari, S., Lee, J. S., Hawley, J. and Stepto, N. K. (2012) Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic western diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302: E1541-E1549.
- Tai, T., Jennermann, C., Brown, K., Oliver, B., MacGinnitie, M., Wilkison, W. O. and Graves, R. (1996) Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor promotes brown adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 271: 29909-29914.
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y. and Sakai, J. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor induces fatty acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 15924-15926.
- Turner, N., Hariharan, K., Tidang, J., Frangioudakis, G., Beale, S. M., Wright, L. E. and Ye, J. (2009) Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. *Diabetes* 58: 2547-2554.
- Wang, Y., Lee, C., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. and Jolla, L. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170.
- Wibom, R., Hultman, E., Johansson, M., Matherei, K., Constantin-Teodosiu, D. and Schantz, P. G. (1992) Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J. Appl. Physiol.* 73: 2004-2010.
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J. and Milburn, M. V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* 3:

- 397-403. Structure and activation of rhodopsin. *Acta Pharmacol. Sin.* 33: 291-299.
- Zhou, X. E., Melcher, K. and Xu, H. E. (2012)